

**Etablierung eines Herstellungsprozesses
für die *ex vivo* Expansion
autologer HPV-spezifischer Lymphozyten
unter GMP-Bedingungen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Stefanie Luckau, geb. Haller
aus Heidenheim an der Brenz

Juni 2015

*Der Fortschritt geschieht heute so schnell,
dass, während jemand eine Sache für gänzlich undurchführbar erklärt,
er von einem anderen unterbrochen wird, der sie schon realisiert hat.*
(Albert Einstein)

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof.'in Dr. Monika Lindemann

2. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Stefan Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2015

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	III
III. Tabellenverzeichnis.....	V
IV. Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
1.1. Kopf-Hals-Tumore	1
1.2. Humanes Papillomavirus (HPV)	2
1.3. Das humane Immunsystem	5
1.4. Neuartige Tumorthérapien.....	8
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Material	12
2.1.1. Reagenzien, Medien und -zusätze, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	12
2.1.2. Antikörper	15
2.1.3. Zellkulturmedien und Zell-Linien	16
2.1.4. Primärzellen	18
2.2. Methoden	18
2.2.1. Gewinnung mononukleärer Zellen	18
2.2.2. Zellzahlbestimmung.....	19
2.2.3. Kryokonservierung	20
2.2.4. Magnetische Zellseparation.....	21
2.2.5. ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot)-Assay	22
2.2.6. Zytotoxizitätstest EuTDA-Assay	24
2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse.....	25
2.2.8. Generierung von B-Lymphoblasten-Zell-Linien (B-LCL) mittels Epstein-Barr Virus (EBV)-Transformation.....	29
2.2.9. Expansion HPV 16-spezifischer T-Lymphozyten	30
2.2.10. Statistische Analysen	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Assay-Optimierung.....	35
3.1.1. ELISpot (Enzyme-Linked-Immunospot)	35
3.1.2. Zytotoxizitätstest.....	39
3.2. Untersuchung von Zellen gesunder Probanden auf HPV-Spezifität	45
3.3. Expansion HPV 16-spezifischer MNZ.....	49
3.3.1. HPV 16-spezifische Expansion vs. CMV-spezifische Expansion	49
3.3.2. HPV-spezifische Expansion mittels reiner Peptidmix-Stimulation	52
3.3.3. HPV-spezifische Expansion: "Beads" als <i>scaffold</i> Reagenzien.....	55

3.3.4. <i>Scaffold</i> Reagenzien: "Beads" vs. TransAct Reagent	62
3.3.5. <i>Scaffold</i> Reagenzien: aktivierte B-Zellen	71
4. Diskussion	74
4.1. Assay-Optimierung.....	74
4.2. Untersuchung von Zellen gesunder Probanden auf HPV-Spezifität.....	77
4.3. Expansion HPV 16-spezifischer MNZ.....	79
5. Zusammenfassung	87
6. Anhang	91
7. Literaturverzeichnis.....	96
Danksagung.....	106
Lebenslauf	107
Eidesstattliche Erklärungen	109

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Organisation des Genoms von HPV 16 (Bild oben und Mitte) und schematische Darstellung der Integration eines Teils des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle (Bild unten).....	5
Abb. 2.1	Ablauf der Ficoll-Separation bei Verwendung von Leucosep™ Röhrchen.	19
Abb. 2.2	Prinzip des ELISpot-Assays.	24
Abb. 2.3	Prinzip des DELFIA® EuTDA Cytotoxicity Assays.....	25
Abb. 2.4	Optisches System des Durchflusszytometers FACSCalibur™.....	27
Abb. 2.5	Beispiel Auswertung der durchflusszytometrischen Populationsanalyse.....	28
Abb. 3.1	Vergleich der Vorinkubation in A) Rundboden (U)- vs. B) Spitzboden (V)-Platten.....	36
Abb. 3.2	Inkubation mononukleärer Zellen in verschiedenen Medien im ELISpot-Assay.	37
Abb. 3.3	Titrationbeispiel für die Detektion von sezerniertem Granzym B.	39
Abb. 3.4	Detektionsbeispiele für IFN-γ, IL-10, Granzym B und Perforin mit optimiertem ELISpot-Protokoll.	39
Abb. 3.5	DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest als NK-Zell-Assay.	41
Abb. 3.6	Vergleich verschiedener Zell-Linien im DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest.....	42
Abb. 3.7	Optimierung des DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstests für adhärenz Zell-Linien, die aus Kopf-Hals-Tumoren etabliert wurden.	43
Abb. 3.8	DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest als T-Zell-Assay.	44
Abb. 3.9	Analyse der IFN-γ Sekretion mononukleärer Zellen von gesunden geimpften oder ungeimpften Probanden nach Stimulation mit HPV 16 E6 und E7.....	46
Abb. 3.10	Verteilung der Zellpopulationen gesunder geimpfter oder ungeimpfter Probandinnen.....	47
Abb. 3.11	Sekretionsprofil von Zellen ungeimpfter männlicher, ungeimpfter weiblicher und geimpfter weiblicher Probanden nach Stimulation mit HPV 16 E6 oder E7 in optimierten ELISpot-Assays.	48
Abb. 3.12	Sekretionsprofil CMVpp65-spezifisch expandierter Zellen vs. HPV 16-spezifisch expandierter Zellen.....	52
Abb. 3.13	HPV 16-spezifische Expansion von T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen mittels reiner Peptidmix-Stimulation.....	53
Abb. 3.14	Funktions- und Spezifitätsanalyse HPV 16-spezifisch expandierter T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen bei reiner Peptidmix-Stimulation.....	55
Abb. 3.15	HPV 16-spezifische Expansion von T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" als <i>scaffold</i> Reagenzien.....	56
Abb. 3.16	Funktions- und Spezifitätsanalyse HPV 16-spezifisch expandierter T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" als <i>scaffold</i> Reagenzien.	57
Abb. 3.17	Optimierung HPV 16-spezifischer Expansionen mit "Beads" als <i>scaffold</i> Reagenzien. Dargestellt sind mediane Werte mit IQR (<i>Interquartile Ranges</i>).	60

Abb. 3.18 HPV 16-spezifische Expansion von CD8 ⁺ CD137 ⁺ T-Zellen unter optimierten Bedingungen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" als <i>scaffold</i> Reagenzien.....	61
Abb. 3.19 HPV 16-spezifische Expansion von CD8 ⁺ T-Zellen unter optimierten Bedingungen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" oder TransAct Reagent als <i>scaffold</i> Reagenzien.....	66
Abb. 3.20 Funktions- und Spezifitätsanalyse HPV 16-spezifisch expandierter CD8 ⁺ T-Zellen unter optimierten Bedingungen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" oder TransAct Reagent als <i>scaffold</i> Reagenzien.	70
Abb. 3.21 EBV (Epstein-Barr-Virus)-transformierte B-LCL (B- <i>Lymphoblastoid Cell Line</i>) als professionelle Antigen-präsentierende Zellen.....	73

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Reagenzien	12
Tab. 2.2	Zellkulturmedien und -zusätze	13
Tab. 2.3	Verbrauchsmaterialien.....	14
Tab. 2.4	Geräte	14
Tab. 2.5	Antikörper für ELISpot-Assays.....	15
Tab. 2.6	Fluorochrom-gekoppelte Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse humaner Blutzellen.....	16
Tab. 2.7	Zusammensetzung der Zellkulturmedien für Zell-Linien.....	16
Tab. 2.8	Zusammensetzung der Zellkulturmedien für Funktionstestungen und Expansionskulturen.	16
Tab. 2.9	Einstellungen der mittels AID iSpot FluoroSpot Reader und AID EliSpot Software quantifizierten Zytokine und zytotoxischen Proteine.	23
Tab. 2.10	Übersicht über die Variablen der einzelnen Expansionsexperimente.....	32
Tab. 3.1	Prozentuale Häufigkeiten des optimalen Verhältnisses zwischen Negativkontrolle und spezifisch stimulierten mononukleären Zellen.....	38
Tab. 3.2	Fluoreszenzwerte des Vergleichs verschiedener Zell-Linien im DELIFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest.....	42
Tab. 3.3	Fluoreszenzwerte der Optimierung des DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstests für adhärente Zell-Linien, die aus Kopf-Hals-Tumoren etabliert wurden.....	43
Tab. 3.4	Sekretion von IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin nach Stimulation mit HPV 16 E6 oder E7 in optimierten ELISpot-Assays bei den verschiedenen Probandengruppen: männlich (M), ungeimpft; weiblich (W), ungeimpft und weiblich (W), geimpft.....	49
Tab. 3.5	Bedingungen zur parallelen Austestung für eine Expansion HPV 16-spezifischer CD8 ⁺ CD137 ⁺ T-Zellen	59
Tab. 3.6	Übersicht der Bedingungen zur Expansion HPV 16 E6- oder E7-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	63
Tab. 6.1	Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für IFN- γ	91
Tab. 6.2	Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für IL-10	92
Tab. 6.3	Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für Granzym B.....	93
Tab. 6.4	Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für Perforin	94
Tab. 6.5	Einzelwerte von nicht HPV geimpften und HPV geimpften Probandinnen im Vergleich zu Normwerten aus der Routinediagnostik des Universitätsklinikums Essen	95

IV. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
APC	<i>Antigen-presenting Cell(s)</i>
BATDA	bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate, lipophiler Ligand
B-LCL	<i>B-Lymphoblastoid Cell Line</i>
CCR / CXCR	Chemokininrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Cytomegalovirus
DC	<i>Dendritic Cell(s)</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EBV	Epstein Barr-Virus
EC	<i>Effector Cell(s)</i> , Effektorzelle(n)
ELISpot	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot</i>
EuTDA	Zytotoxizitätstest basierend auf einem Europium-TDA-Komplex
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice / Protocol</i>
Gy	Gray
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom des Kopf- Hals-Bereichs
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HPV	Humanes Papillomavirus
HPV 16 E6	Early Gene 6, Onkogen des Humanen Papillomavirus Typ 16
HPV 16 E7	Early Gene 7, Onkogen des Humanen Papillomavirus Typ 16
HS	Humanserum
IFN	Interferon
IQR	<i>Interquartile Ranges</i>
IL	Interleukin
IU	<i>International Unit</i>
LCR	<i>Long Control Region</i> , nicht-kodierender Bereich auf dem Genom von HPV
MACS	<i>Magnetic Assisted Cell Sorting</i>
MEM NEAA	<i>Modified Eagle Medium Non-Essential Amino Acids</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	Milliliter
MNZ	Mononukleäre Zelle(n)
MTA	<i>Material Transfer Agreement</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PHA	Phytohemagglutinin
PV	Papillomavirus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium für Leukozyten
RT	Raumtemperatur
SFC	<i>Spot Forming Cell</i>
SSC	<i>Side scatter</i>

TC	<i>Target Cell(s)</i> , Zielzelle(n)
TDA	2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate, hydrophiler Ligand
Th / T _H	T-Helferzelle(n)
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle(n)
U	<i>Unit</i>
WBC	<i>White Blood Cell(s)</i> , Leukozyt(en)

1. Einleitung

1.1. Kopf-Hals-Tumore

Spricht man von Kopf-Hals-Tumoren, sind damit zusammenfassend alle Karzinome, d.h. malignen Tumore, gemeint, die ihren Ursprung im Kopf-Hals-Bereich haben (Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; National Institutes of Health, 2015; Stasche & Schmieder, 2014; Syrjänen S. , 2010). Es geht dabei um Tumore sehr unterschiedlicher Herkunft, vom sinusalen Bereich über die Mundhöhle bis hin zum Rachen- (Pharynx) und Kehlkopfbereich (Larynx) (Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Syrjänen S. , 2010), wobei es sich in über 90% der Fälle um Plattenepithelkarzinome handelt (Cardesa & Nadal, 2011; Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005; Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013). Mit einer geschätzten Zahl von weltweit über 600.000 Neuerkrankungen und über 350.000 Todesfällen pro Jahr zählen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) seit einigen Jahren zu den sechst häufigsten Krebserkrankungen (Chaturvedi, 2012; Ferlay, Shin, Bray, Forman, Mathers, & Parkin, 2010; Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005). In Deutschland erkrankten - und starben - 2010 weit mehr Männer als Frauen an Tumoren im Bereich der Mundhöhle, Pharynx und Larynx (Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013) und auch weltweit fällt die Inzidenz von Kopf-Hals-Karzinomen bei Männern deutlich höher aus als bei Frauen mit 19,1 vs. 5,9 pro 100.000 für Tumore von Mundhöhle und Rachen (Ferlay, Shin, Bray, Forman, Mathers, & Parkin, 2010; Stasche & Schmieder, 2014). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt für Männer und Frauen bei über 60 Jahren (Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Stasche & Schmieder, 2014), wobei sich die Zahlen der jährlichen Neuerkrankungen und Sterbefälle seit der Jahrtausendwende insgesamt nur wenig ändern (Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013). Während die Gesamtzahlen stagnieren, haben sich die Ursachen für die Erkrankungen jedoch deutlich geändert. So wurde vor Jahrzehnten als alleinige Ursache für HNSCC Tabak- und Alkoholkonsum - vor allem in Kombination - angesehen und auch heute noch sind dies die Hauptrisikofaktoren (Barnes, et al., 2005; Blot, et al., 1988; Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Stasche & Schmieder, 2014). Doch bereits in den 1980ern wurde eine Verbindung zwischen der Entstehung von HNSCC und Humanen Papillomaviren (HPVs) hergestellt (Syrjänen & Syrjänen, 1981; Syrjänen, Syrjänen, & Pyrhönen, 1982; Syrjänen, Syrjänen, Lamberg, Pyrhönen, & Nuutinen, 1983). Seither hat sich eine sehr kontroverse Diskussion um die Rolle von HPV als Ursache von HNSCC entwickelt, da die Zahlen stark von der Lokalisation des Tumors abhängen (Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Gillison, et al., 2000; Syrjänen S. , 2010). Die zunehmende Rolle von HPV als Ursache von HNSCC ist mittlerweile jedoch unumstritten (Cardesa & Nadal, 2011; Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Stasche & Schmieder, 2014; Syrjänen S. , 2010; Tommasino,

2014), sodass die Einteilung von HNSCC in HPV-positive und HPV-negative Fälle erfolgt. Dies nicht zuletzt angesichts der Tatsache, dass HPV-positive HNSCC eine deutlich bessere Prognose und Überlebensrate aufweisen - obwohl sie meist erst in späteren Stadien erkannt werden - als HPV-negative HNSCC (Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Heusinkveld, et al., 2012). Je nach Studie handelt es sich bei 20 - 26 % aller HNSCC um HPV-verursachte Tumore (Begum, Cao, Gillison, Zahurak, & Westra, 2005; Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Gillison, et al., 2000; Hoffmann, et al., 2010; Kreimer, et al., 2005; Reimers, et al., 2007; Syrjänen S. , 2010), wobei in 24 % der Tumore im Bereich von Mundhöhle und Larynx und in 36 - 70 % der oropharyngealen Tumore HPV nachweisbar ist (Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Gillison, et al., 2000; Syrjänen S. , 2010). Hierbei ist der vorherrschende HPV Typ der Hochrisiko-Typ 16 mit 68 %, 69 %, bzw. 87 % bei Tumoren der Mundhöhle, Larynx bzw. Oropharynx (Chaturvedi, 2012; Dayyani, Etzel, Liu, Ho, Lippman, & Tsao, 2010; Syrjänen S., 2010). Neben Alkohol- und Tabakkonsum sowie HPV gibt es noch weitere Risikofaktoren, die allerdings nur eine untergeordnete Rolle spielen (Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Stasche & Schmieder, 2014). Anzuführen wären hier mangelhafte Mundhygiene und beruflich bedingte Exposition von Asbest, Nickel, polyzyklischen Kohlenwasserstoffen oder Holzstaub (Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Stasche & Schmieder, 2014). Die aktuellen Therapiemöglichkeiten für Kopf-Hals-Tumore umfassen operative Entfernung des Tumors, meist in Kombination mit einer postoperativen Radio-Chemotherapie oder - wenn eine Operation nicht in Frage kommt - auch alleinige Radiochemotherapie, Induktionstherapie oder palliative Chemotherapie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013; Stasche & Schmieder, 2014; Universitätsklinikum Heidelberg, 2015). Die Wahl der Therapie hängt dabei individuell von der Tumorlokalisation, -art und -stadium ab. Beispielsweise ist ein chirurgischer Eingriff nicht an allen Stellen im Kopf-Hals-Bereich ohne weiteres möglich und auch die Frage, ob es sich um ein Rezidiv oder eine Ersterkrankung handelt und ob Metastasen vorhanden sind, spielt eine nicht unerhebliche Rolle. Da die Überlebensraten für Kopf-Hals-Tumore in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich gestiegen sind (Haddad & Shin, 2008; Masuda, Wakasaki, Toh, Shimizu, & Adachi, 2011; Kostareli, Holzinger, & Hess, 2012) und die Prognosen der mittleren 5-Jahres-Überlebensrate nur zwischen 65 % und 46 % liegen (Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Stasche & Schmieder, 2014), besteht für diese Erkrankung ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuartiger Tumorthérapien. Warum gerade HPV-positive HNSCC hierbei besonders geeignet sind, werden im folgenden Kapitel beschrieben.

1.2. Humanes Papillomavirus (HPV)

Humane Papillomaviren (HPV) gehören zur Gruppe der Papillomiviridae (PV), einer sehr großen, heterogenen Gruppe kleiner, hüllenlose Viren, deren zirkuläres Genom

doppelsträngige DNS enthält (Doorbar, 2006; Faridi, Zahra, Khan, & Idrees, 2011; Ganguly & Parihar, 2009; Rautava & Syrjänen, 2012; Syrjänen, et al., 2011; Tommasino, 2014; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004). HPV besitzen ein ikosaedrisches Kapsid (Doorbar, 2006; Ganguly & Parihar, 2009; Tommasino, 2014) aus 72 Kapsomeren (Faridi, Zahra, Khan, & Idrees, 2011) und bis 2012 wurden annähernd 150 verschiedene Typen erkannt, wobei von mindestens 120 Typen die vollständige Sequenz bekannt ist (Rautava & Syrjänen, 2012; Tommasino, 2014). Die Typen werden auf Grund verschiedener biologischer Eigenschaften und unterschiedlicher Organisation des Genoms in verschiedene Stämme eingeteilt (Doorbar, 2006; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004). Die bekanntesten HPV Typen, HPV 16 und 18, gehören beide dem Stamm der Alpha-Papillomaviren an (Doorbar, 2006; Rautava & Syrjänen, 2012; Tommasino, 2014). Alpha-PV können in Läsionen von Haut und Schleimhaut bei Menschen und Primaten gefunden und sowohl risikoreiche als auch risikoarme PV können dem Alpha-Stamm angehören (Doorbar, 2006; Tommasino, 2014; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004). Die Einteilung risikoarm vs. risikoreich, bezieht sich hierbei auf das mit den PV verbundene Risiko der Entwicklung maligner Tumore basierend auf der klinischen Entwicklung des infizierten Gewebes (Faridi, Zahra, Khan, & Idrees, 2011; Rautava & Syrjänen, 2012; Syrjänen, et al., 2011). Risikoarme Typen sind in gutartigen Läsionen und Warzen zu finden, die teilweise zu Tumoren führen können, wenngleich diese nicht maligne sind (Doorbar, 2006; Ganguly & Parihar, 2009; Rautava & Syrjänen, 2012; Syrjänen, et al., 2011). Risikoreiche Typen werden dagegen in präkanzerösen und kanzerösen Läsionen vorgefunden und können durch Immortalisierung infizierter Zellen zu malignen Tumoren führen (Doorbar, 2006; Ganguly & Parihar, 2009; Rautava & Syrjänen, 2012; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004). Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, wird HPV 16 mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs in Verbindung gebracht, außerdem - wie auch HPV 18 - zu einem hohen Prozentsatz mit Plattenepithelkarzinomen des Zervixbereichs (Doorbar, 2006; zur Hausen, 1996; Tommasino, 2014). Daneben werden risikoreiche HPV Typen mit einer Vielzahl anderer Tumorarten assoziiert, unter anderem Brustkrebs und Tumoren im anogenitalen Bereich (zur Hausen, 1996). Das Genom von HPV 16 umfasst eine Länge von ungefähr 8 kb und liegt, wie oben bereits erwähnt, als doppelsträngige, zirkuläre DNS vor (Doorbar, 2006; Tommasino, 2014). Es besteht aus der nicht kodierende *Long Control Region* (LCR), die ungefähr 1 kb groß ist, sowie den Proteine kodierenden Regionen der frühen (*Early*) und späten (*Late*) Gene, die ungefähr 4 kb, bzw. 3 kb groß sind (Abb. 1.1) (Rautava & Syrjänen, 2012; Tommasino, 2014). Hat das Virus eine noch nicht differenzierte Zelle des basalen Epithels infiziert, wird seine DNS episomal im Nukleus der Wirtszelle repliziert, wobei ein Teil des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle integriert werden kann (Doorbar, 2006; zur Hausen, 1996; Rautava & Syrjänen, 2012). Bei HPV 16 umfasst dieser Bereich einen Teil der L-Gene, die LCR und einen Teil der

E-Gene inklusive der wichtigsten Onkogene E6 und E7, wie in Abb. 1.1 schematisch dargestellt ist (zur Hausen, 1996; Rautava & Syrjänen, 2012). Durch die Integration kommt es zu Überexpression der Onkogene, was im weiteren Verlauf zu Störungen des Zellzyklus und genomischer Instabilität führt (Doorbar, 2006; zur Hausen, 1996; Tommasino, 2014). Eine der hauptsächlichen Funktionen von E6 ist der Abbau des Tumorsuppressorproteins p53. Dadurch wird eine wichtige Kontrolle des Zellzyklus, der DNS-Reparatur und der Apoptoseinduktion ausgeschaltet, was zur Replikation fehlerhafter DNS und damit zur Ansammlung von Mutationen führt (Doorbar, 2006; zur Hausen, 1996; Tommasino, 2014). Des Weiteren verhindert E6 apoptotische Vorgänge, indem es mit verschiedenen zellulär vorkommenden Proteinen verschiedener Anti-Tumor-Signalwegen interagiert, sodass es zur Transformation der Wirtszelle in eine immortalisierte Zelle kommt (Doorbar, 2006; zur Hausen, 1996; Tommasino, 2014). E7 sorgt hauptsächlich durch die Inaktivierung des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein und der CDK-Inhibitoren (*Cyclin dependent kinases*) p27 und p21 für die Deregulierung des Zellzyklus der Wirtszelle und damit zu unkontrollierter Proliferation (Doorbar, 2006; Tommasino, 2014). Jedes der Onkogene für sich genommen ist auf Grund seiner Eigenschaften bereits in der Lage, infizierte Zellen zu immortalisieren und damit die Entstehung und Entwicklung von Tumoren voranzutreiben (zur Hausen, 1996). Der Wirkungsgrad wird durch das Zusammenspiel von E6 und E7 bei gemeinsamer Expression jedoch noch erhöht (zur Hausen, 1996). Natürlich besitzt der menschliche Körper viele Möglichkeiten der Tumorentstehung entgegenzuwirken, wie im nächsten Kapitel zu lesen ist, und nicht jede Infektion mit HPV - gleich ob risikoreich oder nicht - führt automatisch zur Entstehung von Krebs. Wenn sich jedoch ein Tumor entwickelt, dessen Zellen positiv auf HPV getestet werden, ist definitiv eine persistierende Infektion mit den Viruspartikeln die Ursache (Tommasino, 2014). Da die beiden Onkogene E6 und E7 in malignen Geweben gleichbleibend exprimiert werden (zur Hausen, 1996), stellen sie ein exklusiv in den Tumorzellen vorkommendes potentiellles Angriffsziel dar. Damit eignen sich HPV-positive Tumore im Allgemeinen und HPV 16-positive im Speziellen besonders gut für die Entwicklung einer neuartigen zellbasierten Tumorthherapie. Seit einigen Jahren sind bereits präventive Impfstoffe zugelassen, die einer Infektion mit bestimmten HPV Typen, die besonders häufig mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung gebracht werden, vorbeugen sollen (zur Hausen, 2002; National Cancer Institute, 2011). Ein Zweifach-Impfstoff ist gegen HPV 16 und HPV 18 gerichtet (National Cancer Institute, 2011), ein Vierfach-Impfstoff gegen HPV 6, 11, 16 und 18 (National Cancer Institute, 2011). Aktuelle Studien berichten, dass besonders in Ländern, in denen die Impfung flächendeckend als Pflichtimpfung und für beide Geschlechter eingeführt wurde, die Infektionsraten und Auftreten von Läsionen deutlich zurückgegangen sind (Bresse, Goergen, Prager, & Joura, 2014; Chow, et al., 2015; Hariri, et al., 2015; Harrison, et al., 2014; Olsen & Jörgensen, 2015; Rickert, Auslander, Cox, Rosenthal, Rupp, & Zimet, 2015; Stanley, 2014; Tabrizi, et

al., 2014). Da bereits die Rate an Krebsvorstufen zurückgegangen ist, sollte sich auch die Rate der HPV-verursachten Tumore senken. Definitive Daten hierzu können jedoch erst in einigen Jahren oder Jahrzehnten erhoben werden. Auf Grund dieser vielversprechenden ersten Studien werden allerdings bereits weitere präventive HPV-Impfstoffe entwickelt, die gegen mehr Typen gerichtet sein sollen, als die bisherigen.

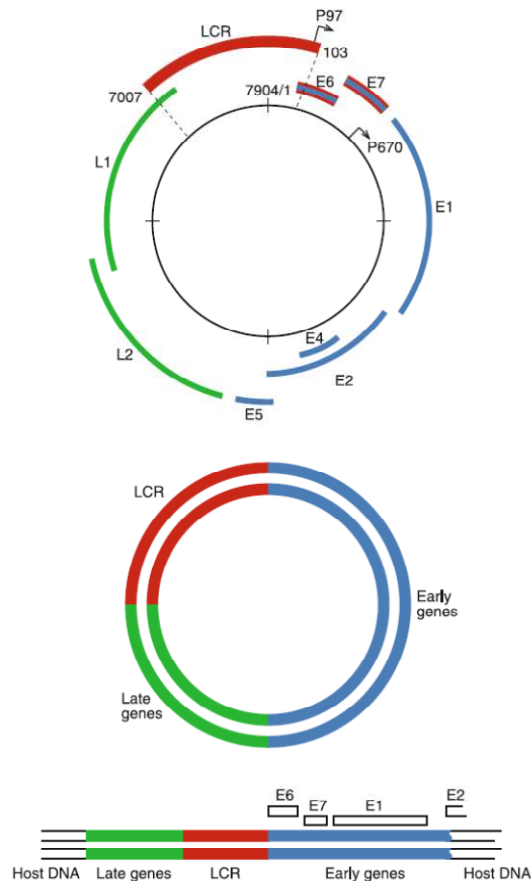


Abb. 1.1 Organisation des Genoms von HPV 16 (Bild oben und Mitte) und schematische Darstellung der Integration eines Teils des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle (Bild unten). LCR: *Long Control Region*, nicht kodierender Bereich des Genoms, der den Replikationsursprung beinhaltet. P97 und P670 sind die beiden Hauptpromotoren im Genom von HPV 16. *Early genes* und *Late genes*: Protein kodierende Regionen. *Host DNA*: DNS des Wirts. *Quelle*: Rautava & Syrjänen, 2012.

1.3. Das humane Immunsystem

Sofern nicht anderweitig gekennzeichnet, stammen die Informationen über das humane Immunsystem aus dem Lehrbuch Janeway's Immunobiology (8th edition) (Murphy, 2011).

Straffe Organisation bei einem sehr komplexen Aufbau sind die Hauptmerkmale des humanen Immunsystems. Es erkennt und bekämpft schädliche Substanzen und Mikroorganismen. Dabei ist es in der Lage, die Immunantwort zu regulieren, sodass dem Körper kein weiterer Schaden zugefügt wird. Außerdem ist das Immunsystem imstande, ein immunologisches Gedächtnis zu bilden und im Fall einer erneuten Bedrohung durch denselben Mikroorganismus schneller und effizienter zu reagieren. Dieser Eigenschaft

bedient man sich bei Schutzimpfungen. Hier werden häufig Teile abgetöteter Mikroorganismen, beispielsweise Viren, einer gesunden Person verabreicht. Spricht das Immunsystem an, werden Gedächtniszellen gegen den Impfstoff gebildet. So kann einer erfolgreichen Infektion mit dem betreffenden Mikroorganismus durch das Immunsystem vorgebeugt werden oder die Infektion schneller aus dem Körper beseitigt werden.

Das humane Immunsystem ist hauptsächlich in zwei Bereiche gegliedert: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist nach den physikalischen und chemischen Barrieren die erste Verteidigungslinie des Körpers. Hauptsächlich beteiligt sind das Komplementsystem und phagozytierende Leukozyten (Makrophagen und neutrophile Granulozyten). Trigger für das angeborene Immunsystem sind Moleküle und molekulare Strukturen, die regulär auf der Oberfläche vieler Mikroorganismen vorkommen, die sogenannten Pathogen-assoziierten Molekülstrukturen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Beispiele für PAMPs sind Bestandteile bakterieller Zellwände: Mannose-haltige Oligosaccharide, Peptidoglykane und Lipopolysaccharide. Während die angeborene Immunantwort eine schnelle, unspezifische Antwort gegen nicht körpereigene Strukturen darstellt, bildet das adaptive Immunsystem eine hochspezifische Antwort aus. Die Immunzellen, die an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind, reagieren spezifisch auf Antigene von Pathogenen, die der Immunantwort des angeborenen Immunsystems entgangen sind. Aus diesem Grund werden allein Antigen-spezifische Lymphozyten dem Bereich des adaptiven Immunsystems angerechnet, alle anderen Zelltypen - eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und dendritische Zellen - werden auf Grund ihrer Funktionsweise zum angeborenen Immunsystem gezählt. Das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität bilden hauptsächlich die dendritischen Zellen. Sie arbeiten ebenso wie Makrophagen als phagozytierende Zellen, prozessieren allerdings die aufgenommenen Partikel und präsentieren prozessierte Peptide auf ihrer Zelloberfläche. Zusammen mit der Präsentation kostimulatorischer Moleküle wird so das adaptive Immunsystem aktiviert. Das adaptive Immunsystem lässt sich ebenfalls in zwei Bereiche gliedern, humoral und zellulär. Die humorale Immunantwort wird durch B-Zellen vermittelt, die zelluläre durch T-Zellen. Auch diese beiden Bereiche arbeiten zusammen, so benötigen B-Zellen nicht nur Antigene zur Aktivierung, sondern auch aktivierende Signale von T-Helferzellen. Die T-Helferzellen sind hierbei der entscheidende Faktor, ob eher eine humorale oder eine zelluläre Antwort erfolgt. Neben direkten Zell-Zell-Interaktionen sind hierfür auch Faktoren, die von den T-Helferzellen sekretiert werden, entscheidend. Diese Faktoren sind die sogenannten Zytokine. Es gibt Zytokine, die die zelluläre Antwort unterdrücken und gleichzeitig die humorale fördern. Man spricht von einer Th2-gerichteten Immunantwort. Beispiele für solche Zytokine sind die Interleukine IL-4 und IL-5. Umgekehrt gibt es ebenso Zytokine, die eine

zelluläre Antwort gegen Viren und intrazelluläre Bakterien fördern und dabei die humorale unterdrücken. Dies ist eine Th1-gerichtete Immunantwort, Beispiel hierfür ist Interferon- γ (IFN- γ), welches nicht nur zur Aktivierung der entsprechenden T-Helferzellen dient, sondern auch von diesen produziert wird. Während die B-Zellen als Effektorfunktion Antikörper sezernieren, die die entsprechenden Antigene binden und neutralisieren oder für die Aufnahme und den Abbau durch phagozytierende Zellen vorbereiten, arbeiten die T-Zellen eher über Zell-Zell-Kontakte und Sekretion aktivierender, inhibierender oder zytotoxischer Substanzen. Die T-Zellen übernehmen dabei in der Immunantwort sehr verschiedene Aufgaben. Entsprechend gibt es verschiedene Subpopulationen, die sich durch verschiedene Oberflächenmarker unterscheiden, hauptsächlich den *clusters of differentiation* (CD) und den Chemokinrezeptoren (CCR oder CXCR). Die Hauptpopulationen sind hierbei zytotoxische, CD8⁺ T-Zellen und Helfer-T-Zellen, die CD4⁺ exprimieren. CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, B und C) gebunden sind. Diese sind auf fast allen Körperzellen zu finden und stellen damit eine der wichtigsten Komponente der Verteidigung gegen virale Infektionen dar, da über diese Moleküle infizierte Zellen erkannt und abgetötet werden können. Auf den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) - dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen - finden sich MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, DQ und DP). Peptide, die hierüber präsentiert werden, werden von CD4⁺ T-Zellen erkannt. MHC-Klasse-II-Moleküle bilden damit den wichtigsten Teil der Steuerung der adaptiven Immunantwort. Sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ T-Zellen können Gedächtniszellen bilden, diese tragen als zusätzliche Marker CD44 und CD45RO⁺, wenngleich dieser nicht exklusiv nur auf Gedächtniszellen vorkommt, sondern auch auf aktivierten T-Zellen (naive T-Zellen tragen dagegen CD45RA⁺), B-Zellen, Monozyten und Granulozyten. Die Population ausdifferenzierter CD4⁺ T-Zellen lässt sich in weitere Gruppen unterteilen, die bekanntesten sind: Helferzellen vom Typ 1 (T_{H1}), Typ 2 (T_{H2}) oder Typ 17 (T_{H17}) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Wie bereits auf der vorigen Seite beschrieben, aktivieren die unterschiedlichen Gruppen an T-Helferzellen verschiedene Bereiche der Immunantwort. Während T_{H1} T-Zellen virale Infektionen und intrazelluläre Bakterien in Schach halten, sind T_{H2} T-Zellen neben der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene auch an allergischen Entzündungsreaktionen beteiligt (Sanguine Biosciences, Inc., 2012). Die Aufgabe von T_{H17} T-Zellen ist der Schutz vor Infektionen mit Pilzen, außerdem sind sie an entzündlichen Immunerkrankungen beteiligt (Sanguine Biosciences, Inc., 2012). Während durch die verschiedenen T-Helferzellen die Immunantwort gefördert wird, steuern die T_{reg} der Immunantwort entgegen und regulieren sie herunter. Auch diese Gruppen lassen sich durch spezifische Biomarker differenzieren. So tragen T_{H1} T-Zellen beispielsweise die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5, T_{H2} T-Zellen die Rezeptoren CCR4 oder CCR3, T_{H17} T-Zellen die Kombination CCR4 und CCR6 (Sanguine Biosciences, Inc., 2012) und T_{reg} exprimieren neben CD25 FoxP3. Im Gegensatz zu B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen, ist

das Schicksal von T-Helferzellen nicht terminiert. Das bedeutet, dass bei entsprechenden Stimuli durch bestimmte Pathogene die Chemokinrezeptoren reorganisiert werden können und so aus T_H1 Zellen auch T_H2 Zellen werden und umgekehrt. Damit kann das Immunsystem sehr schnell flexibel reagieren, ohne erst neue T-Helferzellen ausdifferenzieren zu müssen. Erhalten CD8⁺ T-Zellen die drei Stimulationssignale - Peptidpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle, Kostimulation über entsprechende Rezeptoren und aktivierende Zytokine - wird die spezifische klonale Expansion und Ausdifferenzierung in zytotoxische T-Zellen angeregt. Somit werden Antigen-spezifische T-Zellen generiert, deren Aufgabe es ist, Zielzellen mit den entsprechenden präsentierten Antigenen abzutöten. Hierfür agieren zytotoxische T-Zellen über verschiedene Mechanismen. Direkte Zell-vermittelte Zytotoxizität erfolgt entweder über die Interaktion von FasL (CD178), welches membrangebunden auf den CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird, mit Fas (CD95) auf den Zielzellen oder über die Freisetzung zytotoxischer Moleküle aus Granula. Die Interaktion FasL-Fas induziert in den Zielzellen Apoptose. Bei den sezernierten zytotoxischen Molekülen handelt es sich um Perforin und Granzyme. Perforin bildet auf der Zielzelle Polymere und dadurch Poren in der Zellmembran. Dadurch gelangen die Granzyme ins Innere der Zielzelle. Granzyme sind Serinproteasen, die intrazellulär Caspasen aktivieren und so eine Signalkaskade auslösen, die ebenfalls zur Apoptose der Zielzelle führt. Daneben können zytotoxische T-Zellen weitere Zytokine sezernieren, beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IFN- γ . TNF- α kann hierbei ebenfalls apoptotisch wirken während IFN- γ für die Aktivierung weiterer Immunzellen und die Hochregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Zielzellen sorgt. Wie genau die einzelnen Komponenten des humanen Immunsystems zusammenarbeiten, hängt von der Art des zu bekämpfenden Pathogens ab. Dadurch ist der menschliche Körper in der Lage, sehr komplex auf theoretisch jede Bedrohung angemessen zu reagieren. Die Art und Weise, wie einzelne Zellpopulationen aktiviert und inhibiert werden, lässt sich in *ex vivo* Zellkulturen zu Nutzen machen, indem der Vorgang *in vivo* simuliert wird, beispielsweise durch Gabe bestimmter aktivierender oder inhibierender Zytokine. Von dieser Möglichkeit wird bei der Entwicklung neuartiger Tumorthérapien (siehe nächstes Kapitel) Gebrauch gemacht.

1.4. Neuartige Tumorthérapien

Neben den klassischen Therapiemöglichkeiten, dem operativen Eingriff und Radio- und Chemotherapie, haben sich in den letzten Jahrzehnten rapide eine Vielzahl an neuartigen Therapien zur Behandlung von Tumoren entwickelt. Zu den bekanntesten Möglichkeiten an neuartigen Behandlungsmethoden gehören zielgerichtete Therapien, bei denen niedermolekulare synthetische Substanzen (*small molecule drugs*) oder monoklonale Antikörper zum Einsatz kommen, wobei letzteres auch zum Bereich der Immuntherapien gezählt werden kann (American Cancer Society, Inc., 2014). Ein Großteil der als

Immuntherapie klassifizierten Therapeutika wirkt zielgerichtet, so beispielsweise neben Antikörpern auch Tumorstoffe (*cancer vaccines*) oder somatische Zelltherapeutika (American Cancer Society, Inc., 2014; Paul-Ehrlich-Institut, 2012). Die meisten Ansätze für Tumorstoffe befinden sich derzeit noch in klinischen Studien (Guo, Manjili, Subjeck, Sarkar, Fisher, & Wang, 2013; National Cancer Institute, 2011). Die Entwicklung der Impfstoffe geht dabei in zwei Richtungen, zum einen werden präventive Impfstoffe gegen Mikroorganismen entwickelt, die bekanntermaßen in Verbindung mit Tumorigenese stehen, zum anderen werden Vakzine entwickelt, die der Behandlung bereits bestehender Tumore dienen soll (therapeutische Impfstoffe). Die mittlerweile wohl bekannteste präventive Tumorstoffe ist der in Kapitel 1.2 erwähnte HPV-Impfstoff. Dieser Impfstoff basiert auf HPV-Hüllproteinen (Sanofi Pasteur MSD, 2014) und soll vor allem der Entstehung von HPV-vermittelten Zervixkarzinomen vorbeugen (American Cancer Society, Inc., 2014; Cancer Research UK, 2014; National Cancer Institute, 2011; Rabe, 2015; Robert-Koch-Institut & GEKID e.V., 2013; Sanofi Pasteur MSD, 2014). Bei den therapeutischen Impfstoffen werden verschiedene Ansätze verfolgt, die alle zum Ziel haben, dass das Immunsystem des Patienten (verstärkt) auf den Tumor reagiert (American Cancer Society, Inc., 2014; Guo, Manjili, Subjeck, Sarkar, Fisher, & Wang, 2013). Basierend auf der Funktionsweise oder ihrer Konstruktionsweise lassen sich die therapeutischen Impfstoffe grob in folgende Klassen gliedern: Tumorzellvakzine, bei denen autologe oder allogene Tumorzellen verwendet werden; Protein- oder Peptid-basierte Vakzine, bei denen Tumorantigene verwendet werden; genetische Vakzine, bei denen DNA oder RNA mittels Vektoren verabreicht werden und dendritische Zell-Vakzine, bei denen autolog dendritische Zellen (DC, *dendritic cells*) generiert und mit Tumorbestandteilen beladen werden, bevor sie in den Patienten zurückgegeben werden (Guo, Manjili, Subjeck, Sarkar, Fisher, & Wang, 2013; Vassalli, 2013). Auch im Zusammenhang mit HPV wurde bereits ein Impfstoff entwickelt, der nicht nur präventiv, sondern vor allem therapeutisch wirken soll (Cancer Research Technology, 2005; Hibbitts, 2010; US National Institutes of Health, 2015). Dieser Impfstoff befindet sich zur Zeit noch in der Phase klinischer Studien (Hibbitts, 2010; de Jong, et al., 2002). Die Besonderheit dieses Impfstoff ist, dass er aus einem Fusionsprotein bestehend aus den Proteinen L2, E6 und E7 von HPV 16 enthält (Cancer Research Technology, 2005; Hibbitts, 2010; de Jong, et al., 2002). Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, handelt es sich bei E6 und E7 um die Proteine der Onkogene, die in Zellen HPV-positiver Tumore zu finden sind. L2 ist das kleine Kapsidprotein in der Hülle von HPV 16, das für die Bindung des Virus an die Membran der Wirtszelle und der anschließenden Internalisierung zuständig ist (Rautava & Syrjänen, 2012; Tommasino, 2014). DC-Vakzine können auf Grund ihrer Merkmale auch zu den somatischen Zelltherapeutika gezählt werden, da die DCs substanziell bearbeitet und Patienten zur Behandlung verabreicht werden (Paul-Ehrlich-Institut, 2012). Das Prinzip der Verwendung somatischer Zelltherapeutika basiert auf dem adoptiven Zelltransfer. Für einen adoptiven

Zelltransfer werden Immunzellen autolog oder allogene entnommen, *ex vivo* zur Aktivierung und Verstärkung der gewünschten Funktion bearbeitet und anschließend dem Patienten zur Behandlung verabreicht (Berger, Turtle, Jensen, & Riddell, 2009; Gattinoni, Powell Jr., Rosenberg, & Restifo, 2006; June, 2007; June, 2007; Mendes & American Cancer Society, 2014; National Cancer Institute, 2014; Restifo, Dudley, & Rosenberg, 2012; Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008; Tey, Bollard, & Heslop, 2006). Prinzipiell können alle Typen an Immunzellen im Rahmen einer solchen Therapie eingesetzt werden, vorzugsweise werden jedoch T-Zellen verwendet (Berger, Turtle, Jensen, & Riddell, 2009; Gattinoni, Powell Jr., Rosenberg, & Restifo, 2006; June, 2007; June, 2007; Restifo, Dudley, & Rosenberg, 2012; Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008; Tey, Bollard, & Heslop, 2006). Dabei werden Tumor-reaktive, infiltrierende und zytotoxische T-Zellen für einen direkten Angriff auf Tumorzellen angewendet, während T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen, sowie Gedächtniszellen das Patienteneigene Immunsystem modulieren sollen (June, 2007; June, 2007). Gewonnen werden die T-Zellen entweder aus Tumorsat (Tumor-infiltrierende Lymphozyten, TILs) (Gattinoni, Powell Jr., Rosenberg, & Restifo, 2006; June, 2007; June, 2007; Restifo, Dudley, & Rosenberg, 2012; Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008) oder aus peripherem Blut über Dichtegradientenzentrifugation und Anreicherung der Population mit den gewünschten Biomarkern. Bei der Gewinnung der Immunzellen aus peripherem Blut kann sowohl autologes Patientenmaterial als auch Blut von passenden allogenen Spendern verwendet werden (June, 2007; June, 2007; Tey, Bollard, & Heslop, 2006). Möglichkeiten der Bearbeitung *ex vivo* waren Teil der experimentellen Arbeit und werden entsprechend in Kapitel 3 dargestellt, bzw. in Kapitel 4 diskutiert. Die Behandlungsmöglichkeiten dieser Art Therapie sind sehr vielfältig, da ein adoptiver T-Zelltransfer vollständig individuell auf den Patienten zugeschnitten werden kann. Dadurch lassen sich allerdings nur schwer sogenannten *off-the-shelf*-Ansätze entwickeln, weshalb bisher noch keine Immuntherapie basierend auf dem adoptivem T-Zelltransfer zugelassen ist, wenngleich zur Zeit einige Ansätze in klinischen Studien Anwendung finden (National Cancer Institute, 2014; Mendes & American Cancer Society, 2014).

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Herstellungsprozesses für die *ex vivo* Expansion autologer HPV 16-spezifischer Lymphozyten. Die Besonderheit lag darin, den Herstellungsprozess möglichst unter GMP-Bedingungen auszuarbeiten, sodass ein geeignetes Protokoll im weiteren Forschungsverlauf für Entwicklung einer adoptiven T-Zelltherapie zur Behandlung HPV 16-positiver Kopf-Hals-Tumoren verwendet werden kann. Auf Grund von limitiertem Material von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wurden die Experimente der vorliegenden Arbeit mit mononukleären Zellen aus gesunden Spendern durchgeführt. Bei erfolgreicher Durchführung der Experimente mit diesen Zellen sollte eine Übertragung der Protokolle auf Zellen aus Tumorpatienten möglich sein.

Wichtig war zunächst die Etablierung und Optimierung einer Plattform zur Untersuchung HPV 16-spezifischer Reaktionen von Immunzellen, um die Spezifität und Funktionalität der Zellen *ex vivo* und nach Expansion zu vergleichen. Hierfür wurden ELISpot Assays zur Detektion verschiedener sekretierter Zytokine und zytotoxischer Proteine etabliert, bzw. optimiert. Außerdem habe ich einen nicht-radioaktiver Zytotoxizitätstest für den Nachweis aktiver Zell-vermittelter Zytotoxizität etabliert und hinsichtlich der gegebenen Fragestellung optimiert.

Daneben habe ich verschiedene Kulturbedingungen und -zusätze getestet, um ein möglichst optimales, GMP-konformes Protokoll zur Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen zu entwickeln.

Da seit einigen Jahren HPV-Impfstoffe zugelassen sind, stellte sich des Weiteren die Frage, wie es sich mit der HPV 16-spezifischen Immunität bei Probanden verhält, die mit einem der bereits erhältlichen HPV-Impfstoffe geimpft wurden. So wurde im Rahmen der Studie "Immunität gegenüber humanem Papillomavirus (HPV) bei geimpften und ungeimpften Probanden" die Immunität in entsprechend geimpften und ungeimpften Freiwilligen gegen die Onkogene HPV 16 E6 und E7 mittels optimierten ELISpot-Analysen untersucht. Dies erfolgte insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob sich bei geimpften Spendern mehr HPV 16-spezifische Zellen finden ließen als bei ungeimpften. In diesem Fall wären Zellen HPV-geimpfter Spender besonders gut für die Entwicklung eines Expansionsprotokolls HPV 16-spezifischer Zellen geeignet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien, Medien und -zusätze, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Im Folgenden sind die verwendeten Reagenzien, Zellkulturmedien und -zusätze, Verbrauchsmaterialien und Geräte tabellarisch aufgeführt.

Tab. 2.1 Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Accutase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BD Calibrite™ APC Beads	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Calibrite™ 3 Beads	BD Biosciences (Heidelberg)
BD FACSTo™ Sheath Fluid	BD Biosciences (Heidelberg)
BD FACSTo™ Lysing Solution 10x Concentrate	BD Biosciences (Heidelberg)
CasyTon	Roche (Basel, CH)
CD137 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD8+ T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CellClean™ CL-50	Sysmex GmbH (Nordstett)
Cellpack	Sysmex GmbH (Nordstett)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co.KG (Heidelberg)
DNAse I	Roche (Basel, CH)
D-PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethanol vergällt	Roth (Karlsruhe)
DELFIATM BATDA Reagenz	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
DELFIATM Europium Solution	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
DELFIATM Lysepuffer	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare (Freiburg)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Liquemin® N 25.000	Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, CH)
MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Pan T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
PeliSpot Puffer 10x	Sanquin (Amsterdam, NL)
PepTivator® CMVpp65	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
PepTivator® HPV16 E6	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
PepTivator® HPV16 E7	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Phytohemagglutinin, lyophilisiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Streptavidin-poly-HRP Konjugat	Sanquin (Amsterdam, NL)
Stromatolyser®-WH	Sysmex GmbH (Nordstett)
TMB substrate	Sanquin (Amsterdam, NL)
Trypanblau 0,4 %	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 2.2 Zellkulturmedien und -zusätze

Bezeichnung	Firma
AIM-V® (+ AlbuMAX® + L-GLutamin + 50 µg/mL Streptomycinsulfat + 10 µg/mL Gentamicinsulfat)	Gibco®, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Anti-Biotin MACSiBead™ Particles	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD3-Biotin, functional grade, human (Klon OKT3, 100 µg/mL)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD28-Biotin, functional grade, human (Klon 15E8, 100 µg/mL)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
DMEM (4,5g/L Glucose + L-Glutamine + Sodium Pyruvate)	PAA (Pasching, Österreich) / GE Healthcare (Freiburg)
EBV-haltiger Überstand der Zell-Linie B95.8	Institut für Zelltherapeutische Forschung, Universitätsklinikum Essen (Essen)
FCS Gold	PAA (Pasching, Österreich) / GE Healthcare (Freiburg)
Human Interleukin (IL)-7, premium grade	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Human IL-15, premium grade	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Human IL-21, premium grade	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Humanserum (HS)	Eigene Herstellung am Institut für Transfusionsmedizin des UK Essen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MEM NEAA 100x	Gibco®, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	PAA (Pasching, Österreich) / GE Healthcare (Freiburg)
Proleukin S	Siemens Healthcare (Siemens AG, Erlangen)
RPMI1640 (+L-Glutamine + HEPES)	Gibco®, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
TexMACS Medium	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
TransAct Reagent CD3	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) (per <i>Material Transfer Agreement</i> (MTA))
TransAct Reagent CD28	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) (per MTA)

Tab. 2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD TruCount™ Absolute Counting Tubes	BD Biosciences (Heidelberg)
Casy Cups	Roche (Basel, CH)
DELFI [®] Microtiterplatten (96er)	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Einfrierröhrchen (2 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson GmbH
Filter (0,22 und 0,45 µm Porengröße)	Corning (New York, NY, USA)
Flow Cytometry Röhren	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterplatten MAIPN4550	Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt)
Leucosep™ Röhrchen (50 mL)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
MACS Separationssäulen (LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Pipettenspitzen (5 µL bis 300 µL)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Polypropylen-Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Stabpipetten (5, 10, 25, 50 mL)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkultur Microplatte (F-Boden 6er - 96er, U-Boden 96er, V-Boden 96er)	Greiner bio-one (Frickenhausen)

Tab. 2.4 Geräte

Gerät	Modelbezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell240	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Bestrahlungsgerät	IBL437 C	CIS bio GmbH (Berlin)
Durchflusszytometer	FACSCalibur™ Software: BD FACSComp™ software BD CellQuest Pro™	BD Biosciences (Heidelberg)
ELISpot Reader	AID iSpot FluoroSpot Reader System Software: EliSpot 6.0iSpot	Autoimmun Diagnostika GmbH (Strassberg)
Einfrierhilfe	Mr. Frosty Typ 5100	Nalgene (Waltham, USA)
Fluoreszenzmessgerät	DELFI [®] Fluorometer	Wallac Oy (Turku, Finnland)
Mikroskop	Axio Vert.A1 Software: AxioVision Rel 4.8	Zeiss (Jena)
Schüttler	VWR Tube Rotator	VWR (Langenfeld)

Starkmagnet	MACSiMAG™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Vortex	ParaMix II	Julabo GmbH (Seelbach)
Zellkulturbank	HERAsafe KS12	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zellzählgerät	Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex GmbH (Nordstett)
	Casy TTC mit Kapillare 150	Roche (Basel, CH)
Zellseparator	MACS MultiStand mit MidiMACS™ und QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Zentrifugen	Heraeus Varifuge 3.0R	Thermo Scientific (Waltham, USA)
	Heraeus Pico 21	Thermo Scientific (Waltham, USA)

2.1.2. Antikörper

Im Folgenden sind die im ELISpot-Assay und in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper tabellarisch aufgeführt.

Tab. 2.5 Antikörper für ELISpot-Assays

Antikörper	Konzentration	Arbeitslösung	Hersteller
Anti-Human IFN-γ mAb 1-D1K	1 mg/mL	10 µg/mL	Mabtech AB (Nacka Strand, S)
Anti-Human IFN-γ 7-B6-1-Biotin	1 mg/mL	2 µg/mL	Mabtech AB (Nacka Strand, S)
Anti-Human IL-10 mAb 9D7	1 mg/mL	10 µg/mL	Mabtech AB (Nacka Strand, S)
Anti-Human IL-10 mAb 12G8-Biotin	1 mg/mL	2 µg/mL	Mabtech AB (Nacka Strand, S)
Granzyme B monoclonal antibodies; Clone GB10	1 mg/mL	15 µg/mL	TEC-Thomas Ehret Consult (Nidderau)
Granzyme B biotin labelled monoclonal abs, Clone GB11	1 mg/mL	1 µg/mL	TEC-Thomas Ehret Consult (Nidderau)
Anti-Human Perforin mAb Pf-80/164	1 mg/mL	30 µg/mL	Mabtech AB (Nacka Strand, S)
Anti-Human Perforin mAb Pf-344-Biotin	1 mg/mL	1 µg/mL	Mabtech AB (Nacka Strand, S)

Die nicht biotinylierten Erstantikörper wurden in D-PBS verdünnt, biotinylierte Zweitantikörper in 1 x PeliSpot Puffer.

Tab. 2.6 Fluorochrom-gekoppelte Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse humaner Blutzellen

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Hersteller
MultiTEST 3/8/45/4	FITC/PE/PerCP/APC	SK7/SK1/2D1/SK3	BD Biosciences (Heidelberg)
MultiTEST 3/16+56/45/19	FITC/PE/PerCP/APC	SK7/B73.1/NCAM16.2/ 2D1SJ25C1	BD Biosciences (Heidelberg)
CD14	APC	MoP9	BD Biosciences (Heidelberg)

2.1.3. Zellkulturmedien und Zell-Linien

Die verwendeten Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt. Alle Medien enthielten zur pH-Kontrolle Phenolrot (pKs = 7,4). Die aufgeführten Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tab. 2.7 Zusammensetzung der Zellkulturmedien für Zell-Linien.

K562	UPCI-SCC-090	UT-SCC-050
10 % FCS	10 % FCS	10 % FCS
1 % Pen/Strep	1 % Pen/Strep	1 % Pen/Strep
200 µg / mL L-Glutamin in RPMI1640 (Leibniz-Institut DSMZ)	1 x MEM NEAA (Stock 100x) in DMEM (Leibniz-Institut DSMZ)	200 µg / mL L-Glutamin in RPMI1640 (Forschungsabteilung der HNO, Universitätsklinikum Essen)

Tab. 2.8 Zusammensetzung der Zellkulturmedien für Funktionstestungen und Expansionskulturen

Funktionstestungen	Expansionsmedium
10 % HS	1 % Pen/Strep
1 % Pen/Strep	200 IU / mL Proleukin®
200 µg / mL L-Glutamin	10 U / mL IL-7
in RPMI1640	10 oder 20 U / mL IL-15
verwendet für Testungen von frisch isolierten MNZ und expandierten T-Zellen im ELISpot- und EuTDA-Assay	0,3 oder 0,6 U / mL IL-21 in TexMACS™

K562

Die ursprüngliche Zell-Linie wurde 1970 aus leukämischen Zellen des Pleuraergusses einer 53-jährigen Kaukasierin etabliert. Die Patientin litt an CML (Chronischer Myeloischer Leukämie) und befand sich im Stadium der Blastenkrise bei Entnahme der Flüssigkeit

(Lozzio & Lozzio, 1975). Zellen der etablierten Linie zeigten eine natürliche Suszeptibilität gegenüber isolierten humanen Lymphozyten (Lozzio & Lozzio, 1979), sodass sie sich als hochempfindliche Zielzelle für in vitro NK-Assays etabliert haben (ATCC; Leibniz-Institut DSMZ). Die natürliche Suszeptibilität basiert auf der fehlenden Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen (Koeffler & Golde, 1980; Leibniz-Institut DSMZ). Diese Eigenschaften machen die K562 zum idealen Kandidaten für die Etablierung von Zytotoxizitätstesten. Die Suspensionszellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen liegend kultiviert und alle 3 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet, sodass 0,3 - 0,5 * 10⁶ Zellen / mL neu ausgesät wurden.

UT-SCC-050

Die Zell-Linie wurde im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise von der Forschungsabteilung der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (HNO) unter der Leitung von Prof. S. Brandau zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine humane Zell-Linie, die aus dem Plattenepithelkarzinom aus dem Kopf-Hals-Bereich eines Patienten etabliert wurde. Die Zell-Linie ist negativ für HPV 16 und diente in Zytotoxizitätstestungen als experimentelle Kontroll-Zielzell-Linie zur Bestimmung von HPV 16-spezifischem zytotoxischem Potential von expandierten T-Zellen. Die adhärenzte Zell-Linie wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 10 mL Zellkulturmedium kultiviert. Alle 3,5 Tage wurden die Zellen - bei 80 - 90 % Konfluenz - mit Accutase abgelöst. Hierfür wurden die adhärenzten Zellen mit 10 mL D-PBS gewaschen, um totes, nicht adhärenztes Material zu entfernen. Anschließend wurde 3 mL Accutase auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 3 mL D-PBS vom Boden der Zellkulturflasche abgewaschen und die Suspension vollständig in ein Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 6 min bei 500 x g pelletiert, einmal mit 10 mL D-PBS gewaschen, um Accutase-Reste zu entfernen, erneut pelletiert und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Lebend-Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung (1:1) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 1,5 * 10⁶ Zellen wurden in neue 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

UPCI-SCC-090

Auch diese Zell-Linie wurde im Rahmen der Kooperation freundlicherweise von der Forschungsabteilung der HNO-Klinik unter der Leitung von Prof. S. Brandau zu Verfügung gestellt. Die humane Zell-Linie stammt aus dem oralen Plattenepithelkarzinom eines 46-jährigen Kaukasiers (Ferris, et al., 2005; Leibniz-Institut DSMZ; Martin, et al., 2008) und trägt eine hohe Zahl integrierter Kopien von HPV 16 (Ferris, et al., 2005; Leibniz-Institut DSMZ). Die Onkogene HPV 16 E6 und E7 sind in dieser Zell-Linie hochexprimiert (Ferris, et al., 2005), sodass sich die Zellen ausgezeichnet als Zielzellen in Zytotoxizitätstestungen zur Darstellung von HPV 16-spezifischem zytotoxischem Potential expandierter T-Zellen eignet. Die adhärenzte Zell-Linie wurde ebenso wie die UT-SCC-050 in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 10 mL Zellkulturmedium kultiviert. Alle 3,5 Tage wurde entweder ein vollständiger

Medienwechsel vorgenommen oder die Zellen bei 80 - 90 % Konfluenz ebenfalls mit Accutase abgelöst und $1,5 \cdot 10^6$ Zellen neu ausgesät. Hierbei wurde dasselbe Protokoll verwendet, wie zum Ablösen der UT-SCC-050.

2.1.4. Primärzellen

Die Versuche mit humanem Zellmaterial wurden mit Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen durchgeführt, bzw. im Einklang mit der freiwillig unterschriebenen Einverständniserklärung bei Vollblutspenden, dass Restmaterial der Blutspende für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden kann. Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Blut gesunder Spender wurden entweder Buffy Coats oder Apherese-Sets anonymisiert vom Blutspendedienst des Instituts für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchung gesunder Probanden auf HPV-Spezifität im Rahmen der Studie "Immunität gegenüber humanem Papillomavirus (HPV) bei geimpften und ungeimpften Probanden" wurde freiwilligen Spendern nach Erklärung ihres Einverständnisses am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen Blut entnommen (30 mL in Heparin-Monovetten für ELISpot-Analysen, 5 mL in EDTA-Monovetten für durchflusszytometrische Analysen).

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung mononukleärer Zellen

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen (MNZ) aus antikoaguliertem Blut wurden zwei Varianten der klassischen Ficoll-Separation verwendet (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, Ficoll-Separation, 2008). Als Zellseparationsmedium wurde in beiden Fällen Ficoll-Paque PLUS, eine Ficoll-Hypaque Fertiglösung, verwendet. Außerdem wurde für beide Varianten das zu isolierende Blut 2:1 mit D-PBS verdünnt. Variante 1 war die klassische Überschichtung von 20 - 25 mL Blutgemisch auf 15 mL Separationsmedium in einem 50 mL Polypropylen-Röhrchen, gefolgt von 20 min Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) und $1.400 \times g$ ohne Bremse. Bei Variante 2 wurde ebenfalls 20 - 25 mL Blutgemisch auf 15 mL Separationsmedium verwendet, allerdings in einem 50 mL LeucosepTM Röhrchen, einem Polypropylen-Röhrchen, in welches eine poröse Trennscheibe aus Polyethylen fest eingesetzt ist (Greiner Bio-One International). Dadurch wird das zeitaufwändige Übersichten deutlich verkürzt, was vor allem bei einer großen Menge Proben von Vorteil ist, um der Zytotoxizität des Ficolls im Separationsmedium vorzubeugen. Außerdem sieht das Protokoll des Herstellers eine deutlich schonendere Zentrifugation zur Separation der Zellpopulationen vor: 10 min bei RT und $1.000 \times g$ ohne Bremse. Mit dieser Variante war der Zeitaufwand zur Isolation der MNZ insgesamt deutlich verkürzt. Ist allerdings eine sehr hohe Zahl an MNZ zu erwarten, beispielsweise bei der Isolation aus Apherese-Sets, empfahl sich die Verwendung von Variante 1, da hier nach dem Separationsschritt die MNZ-Schicht sehr

tief im Röhrchen saß. Bei Verwendung der Leucosep™ Röhrchen saß die Schicht entsprechend direkt auf der Trennscheibe, statt optimalerweise ein Stück darüber (Abb. 2.1), was die vollständige Abnahme der MNZ-Schicht mittels Pipette erschwerte und zu einer geringeren Zellausbeute führte. Bei beiden Varianten waren nach der Separation folgende Schichten im Röhrchen - von unten nach oben - sichtbar: rotes Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, durchsichtiges Separationsmedium, milchig-weiße Interphase aus MNZ, gelbliches Plasma. Die Interphase wurde vollständig in neue 50 mL Polypropylen-Röhrchen mit 15 mL D-PBS pipettiert und 10 min bei RT und 250 x g mit Bremse zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 35 mL D-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert, bevor die Zellen in RPMI1640 mit 200 µg / mL L-Glutamin und 1 % Pen/Strep zur Zellzahlbestimmung resuspendiert wurden.

Arbeitsablauf



Abb. 2.1 Ablauf der Ficoll-Separation bei Verwendung von Leucosep™ Röhrchen. Die Röhrchen werden mit Separationsmedium nach Herstellerangaben vorgefüllt und zentrifugiert, damit das Separationsmedium unter die Trennscheibe gelangt. Anschließend wird das Blut-D-PBS-Gemisch in das Röhrchen gegeben (1), sodass es sich vor Zentrifugation oberhalb der Trennscheibe befindet (2). Nach der Zentrifugation sind folgende Schichten sichtbar (3): a) Plasma, b) Interphase aus mononukleären Zellen, c) und e) Separationsmedium, d) Trennscheibe, f) Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Zur Gewinnung der mononukleären Zellen wird die Interphase in ein neues Röhrchen ohne Trennscheibe überführt (4). *Quelle:* Greiner Bio-One International.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung der MNZ und angereicherten T-Zellen wurde mittels Zellzählgeräten durchgeführt. Die Zellzahl frisch isolierter Zellen wurde mit Hilfe des automatischen Hämatologie-Analysators KX-21N bestimmt. Hierfür wurden nach Herstellerangaben 20 µL Zellsuspension mit 500 µL Cellpack vermischt und im vorverdünnten Modus automatisch gemessen. Die Ausgabe erfolgte als WBC (*White Blood Cells*, Leukozyten) pro µL.

Die Zellzahl kryokonservierter und expandierter Zellen wurde mit Hilfe des CasyTTC bestimmt. Der Vorteil dieses Geräts ist die Profildarstellung der gemessenen Zellen inklusive der manuellen Speicherung der Messgrenzen zur Bestimmung der Zellzahl unter Ausschluss toten Materials. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 mL CasyTon vermischt und mittels Kapillare 150 gemessen (Protokoll der Forschungsabteilung der HNO-Klinik, Universitätsklinikum Essen). Diese Kapillare hat einen Durchmesser von 150 µm und wird zur Messung von Zell-Linien, primären Säugerzellen, weiße Blutzellen, Stammzellen, u.a. verwendet (OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG). Als untere Grenze zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 4,5 µm festgelegt, der Bereich der Lebendzellzahl wurde entsprechend dem Peak angepasst. Hintergrund war, dass sich die Größe der Zellen über den Expansionszeitraum hinweg veränderte, wodurch eine manuelle Korrektur der Grenzen erforderlich war. Der übliche Messbereich für Lymphozyten liegt bei 7 - 12 µm (Murphy, 2011), während der Expansion waren die Zellen je nach Expansionsphase allerdings zeitweise von 6 µm bis zu 16 µm groß, wobei sich nicht der Messbereich von ca. 5 µm verändert hat, sondern der gesamte Peak in Richtung 6 µm oder 16 µm verschoben war.

2.2.3. Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die gewünschten Zellen pelletiert (6 min Zentrifugation bei RT und 500 x g mit Bremse) und in Einfriermedium ohne DMSO je nach Menge zu $1 \cdot 10^7$ bis $1,5 \cdot 10^8$ Zellen / mL resuspendiert. Als Einfriermedium wurde das im Labor optimierte Medium aus 90 % FCS Gold, 0,001 % DNase I, 0,002 % Liquemin und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Das DMSO wurde nach dem Resuspendieren der Zellen langsam unter ständigem Vermischen zugegeben. Die Suspension wurde à 1 mL in 2 mL Einfriereröhrchen abgefüllt und mittels einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe, die das gleichmäßige Einfrieren mit der Rate von 1°C / min ermöglicht, bei -80°C eingefroren. Die Lagerung eingefrorenen Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff.

Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte möglichst zügig im Wasserbad bei 37°C. Die bis auf einen kleinen Eiskern aufgetaute Suspension wurde in 10 mL Basismedium (RPMI1640 mit 200 µg / mL L-Glutamin und 1 % Pen/Strep) überführt. Die Zellen wurden wie zu Beginn beschrieben pelletiert, einmal mit D-PBS gewaschen, erneut pelletiert und in Basismedium zur Zellzahlbestimmung resuspendiert. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen in Zellkulturgefäßen entsprechend dem vorhandenen Volumen mit $5 - 8 \cdot 10^6$ Zellen / mL ausgesät und über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen nochmals pelletiert und gewaschen, um totes Material aus der Kultur zu entfernen. Die Zellzahl wurde vor Verwendung in den jeweiligen Experimenten erneut bestimmt.

2.2.4. Magnetische Zellseparation

Mittels magnetischer Zellseparation wurden Subpopulationen der MNZ-Fraktion angereichert, je nach Art des Protokolls über Negativselektion, sodass die gewünschte Population ungebunden im Durchfluss zu finden war, oder über Positivselektion, sodass die gewünschte Population magnetisch an die Separationssäule gebunden war und eluiert werden musste. Als Separationssystem wurde die MACS-Technologie (MACS = *Magnetic Assisted Cell Sorting*) zusammen mit den entsprechenden Kits von Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben verwendet. Über Negativselektion wurde die gesamte Population an T-Zellen (Pan T Cell Isolation Kit, human) oder CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺ T Cell Isolation Kit, human) aus MNZ-Fraktionen angereichert. Beide Kits laufen nach demselben Prinzip ab, es unterschied sich lediglich die Zusammensetzung der biotinylierten Antikörper-Cocktails zur Markierung der nicht erwünschten Populationen, wie Monozyten, B-Zellen, Stammzellen, dendritische Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, erythroide Zellen oder - im Fall der Isolation von CD8⁺ T-Zellen - CD4⁺ T-Zellen. Der Antikörper-Cocktail des Kits zur Isolation von T-Zellen enthielt Antikörper gegen CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 und CD235a (Miltenyi Biotec); der des Kits zur Isolation von CD8⁺ T-Zellen enthielt Antikörper gegen CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und CD235a (Miltenyi Biotec). Für die Isolation wurde die gewünschte MNZ-Fraktion pelletiert und nach Herstellerangaben in MACS Separation Buffer (0,1% BSA *plus* 2 mM EDTA in PBS, möglichst ständig bei 4°C gehalten) resuspendiert (pro 10⁷ Zellen 40 μ L), der gewünschte Biotin-Antikörper-Cocktail zugegeben (pro 10⁷ Zellen 10 μ L) und 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde erneut MACS Separation Buffer (pro 10⁷ Zellen 30 μ L) und der entsprechende MicroBead-Cocktail, der über Bindung der biotinylierten Antikörper die nicht erwünschten Populationen mit magnetischen Partikeln versah, zugegeben (pro 10⁷ Zellen 20 μ L) und 10 min bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurden LS-Säulen in die entsprechende magnetische Separationseinheit gesetzt und nach Herstellerangaben mit 3 mL MACS Separation Buffer äquilibriert, bevor die Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde. Nachdem die Suspension in die Säule eingelaufen war, wurde diese gründlich mit MACS Separation Buffer (4 x mit je 3 mL) gewaschen und so die gewünschte Fraktion eluiert. Zur Isolation der in der Säule gebundenen Positiv-Fraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen samt gebundener magnetischer Partikel mittels MACS Separation Buffer (2 x 5 mL) mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt. Positiv- und Negativfraktion wurden abschließend pelletiert und zur Zellzahlbestimmung in D-PBS resuspendiert. Die Positiv-Fraktion wurde mit 30 Gy im Bestrahlungsgerät IBL437 C bestrahlt und als Feeder der Expansionskultur im Verhältnis 10:1 zugesetzt. Für einige Experimente wurden aus der Negativ-Fraktion aktivierte T-Zellen als weitere Subpopulation angereichert. Dies erfolgte über den Marker CD137 mittels Positiv-Isolation (Miltenyi Biotec). Hierfür wurden die Zellen erneut pelletiert und nach Herstellerangaben in MACS Separation Buffer

resuspendiert (pro 10^7 Zellen 40 μL), der Antikörper CD137-PE zugegeben (pro 10^7 Zellen 10 μL) und 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde zum Auswaschen von ungebundenem Antikörper 1 mL MACS Separation Buffer zugeben und die Zellen 10 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in MACS Separation Buffer resuspendiert (pro 10^7 Zellen 80 μL), Anti-PE MicroBead-Cocktail zur Bindung positiv markierter T-Zellen zugegeben (pro 10^7 Zellen 20 μL) und 15 min bei 4°C inkubiert. Zum Auswaschen ungebundener magnetischer Partikel wurde anschließend 2 mL MACS Separation Buffer zugegeben und erneut 10 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Währenddessen wurden LS-Säulen in die entsprechende magnetische Separationseinheit gesetzt und nach Herstellerangaben mit 3 mL MACS Separation Buffer äquilibriert. Das Pellet wurde in MACS Separation Buffer resuspendiert (bis zu 10^8 Zellen in 500 μL) und auf die Säule gegeben. Nachdem die Suspension in die Säule eingelaufen war, wurde diese gründlich mit MACS Separation Buffer (4 x mit je 3 mL) gewaschen und so CD137⁺ T-Zellen eluiert. Zur Isolation der gewünschten, in der Säule gebundenen Fraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die CD137⁺ T-Zellen samt gebundener magnetischer Partikel mittels MACS Separation Buffer (2 x 5 mL) mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt. Zur Expansion wurden entweder diese CD137⁺ T-Zellen oder - in späteren Versuchen - CD8⁺ T-Zellen verwendet.

2.2.5. ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot)-Assay

Der ELISpot-Assay dient der Messung der Sekretion von Zytokinen auf Einzelzellniveau. Für diese Arbeit wurde ein im Labor von Prof.in M. Lindemann für PVDF-Filterplatten (Filter aus Polyvinylidenfluorid) entwickeltes ELISpot-Protokoll für die Messung HPV 16-spezifischer Immunantworten optimiert (siehe Kapitel 3.1.1). Hier wird das Basis-Protokoll beschrieben, an dem für diese Arbeit nichts optimiert wurde. Abb. 2.2 (S. 24) zeigt den schematischen Ablauf. Der erste Schritt bestand aus der parallelen über Nacht Vorinkubation von 200 μL Zellsuspension pro Kultur in 96-well Platten bei 37°C und 5 % CO_2 mit oder ohne entsprechendem Antigen-Peptidmix oder Phytohemagglutinin (PHA) als Positivkontrolle und Beschichtung der Filterplatten MAIPN4550. Hierfür wurden die Filterplatten zur Aktivierung mit 100 μL pro well 70 % Ethanol für 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Flüssigkeit ausgeschlagen und die Platte ohne Boden mit Leitungswasser (LW) und vollentsalztem Wasser (VE- H_2O) von beiden Seiten gewaschen. Die aktivierte Platte wurde in eine passende leere Box gesetzt, sodass die Filter keine Berührungspunkte hatten, und die Filter mit D-PBS äquilibriert. Zum Äquilibrieren und späteren Waschen der Filter mit D-PBS wurden 300 μL pro well verwendet. Anschließend wurden die Filter mit 60 μL Erstantikörperlösung (Konzentrationen siehe Tab. 2.5, S. 15) pro well über Nacht bei 4°C beschichtet. Um einer möglichen Verdunstung vorzubeugen, wurde hierfür die Box mit Parafilm verschlossen. Am nächsten Tag wurde die Filterplatte ausgeschlagen und einmal mit LW und VE- H_2O , sowie fünfmal mit D-PBS gewaschen. Danach wurden die Filter pro well

mit 100 µL 1 x PeliSpot-Puffer in Aqua dest. für 1 h bei 37°C blockiert, anschließend ausgeschlagen und die vorinkubierten Zellen auf die Platten überführt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ auf der Filterplatte inkubiert, sodass sezernierte Zytokine spezifisch an die Erstantikörper binden konnten. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Ausschlagen der Flüssigkeit und sechsmaliges Waschen, einmal mit LW und VE-H₂O und fünfmal mit D-PBS, entfernt. Gebundene Zytokine wurden mittels entsprechenden biotinylierten Zweitantikörper detektiert. Hierfür wurden pro well 60 µL Biotin-Zweitantikörperlösung (Konzentrationen siehe Tab. 2.5, S. 15) pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Filterplatte erneut sechsmal gewaschen und pro well 100 µL Streptavidin-poly-HRP-Konjugat (HRP = *horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase), verdünnt 1 : 6.000 in 1 x PeliSpot Puffer, auf die Filter gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Filterplatte nochmals sechsmal gewaschen und 50 µL pro well Farbsubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) für 3 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Ausschlagen der Platte und ausgiebiges Waschen mit LW und VE-H₂O gestoppt. An Stellen mit sezernierten, gebundenen Zytokinen und zytotoxischen Proteinen wurde das Farbsubstrat durch die Meerrettichperoxidase umgesetzt, sodass eine blau-lila Färbung in Form eines Punktes (Spots) zu sehen war. Je nach detektiertem Zytokin oder zytotoxischen Protein hatten die Spots andere Charakteristika, sie unterschieden sich in Form, Größe und Intensität, sodass für jedes gemessene Protein ein eigenes Messprofil angelegt wurde (Tab. 2.9). Die Spots wurden mit Hilfe des AID iSpot FluoroSpot Readers und der AID EliSpot Software Version 6.0 quantifiziert.

Tab. 2.9 Einstellungen der mittels AID iSpot FluoroSpot Reader und AID EliSpot Software quantifizierten Zytokine und zytotoxischen Proteine

Kameraeinstellungen		Profil	IFN-γ	IL-10	Granzym B	Perforin
Brightness	226	Intensity MIN	5	5	30	15
Sharpness	1	Size MIN	90	25	340	50
White Balance (R = Rot); (B = Blau)	403; 383	Gradient MIN	1	2	1	1
Hue	63	Basic Algorithm	Huge	Small	Big	Small
Saturation	172	Settings emphasis				
Shutter (exposure)	675	Algorithm	A	A	C	A
Gain	96	TNTC well saturation	80 %			
		Count speed	Max. Quality			

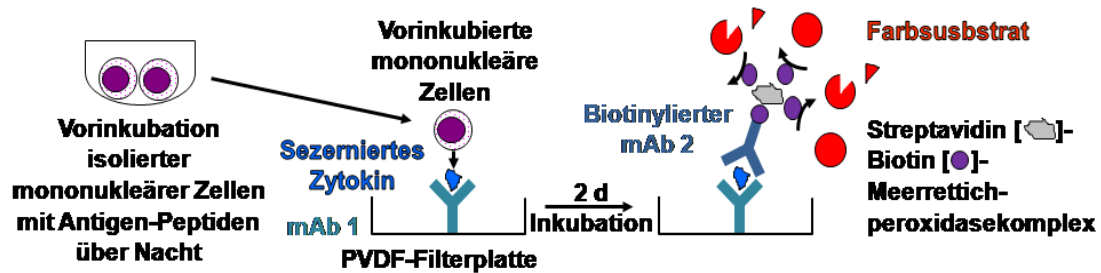


Abb. 2.2 Prinzip des ELISpot-Assays. Isolierte mononukleäre Zellen werden in 96-well Platten über Nacht vorinkubiert. Parallel werden PVDF-Filterplatten mit einem monoklonalen Erstantikörper (mAb 1) beschichtet. Die vorinkubierten mononukleären Zellen werden auf den beschichteten Filterplatten inkubiert, in dieser Zeit werden sezernierte Zytokine spezifisch an die Erstantikörper gebunden. Nach zwei Tagen (2 d) Inkubation werden die Zellen abgewaschen und die gebundenen Zytokine mittels biotinylierter monoklonaler Zweitantikörper (mAb 2) und Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidasekomplexe detektiert. Über den Farbumschlag eines Farbsubstrats, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), das von der Meerrettichperoxidase umgesetzt werden kann, werden auf den Filtern Spots an den Stellen sichtbar, an denen zuvor sezernierte Zytokine gebunden haben.

2.2.6. Zytotoxizitätstest EuTDA-Assay

Als Zytotoxizitätstest wurde das Kit DELFIA® EuTDA Cytotoxicity Reagents verwendet (Perkin Elmer Inc.). Dies ist ein nicht radioaktiver Test, bei dem ein lipophiler Ligand, bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate (BATDA), in die gewünschten Zielzellen gebracht wurde, wo er in seine hydrophile Form, 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate (TDA), umgesetzt wurde und somit im Zellinneren verblieb. Nach Zerstörung der Plasmamembran, z.B. durch Effektorzellen, wurde das TDA freigesetzt. TDA in Verbindung mit der im Kit enthaltenen Europiumlösung bildete ein stabiles, fluoreszierendes Chelat, das mittels zeitaufgelöster Fluorometrie quantitativ gemessen wurde. Dieser generelle Ablauf ist in Abb. 2.3 dargestellt. Da die verwendeten Reagenzien des Kits temperaturempfindlich sind, wurde für die Durchführung der Experimente lediglich die jeweils benötigte Menge an Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt, um zu große Kälte für die verwendeten Zellen zu vermeiden. Für die Markierung der Zielzellen wurde mittels Trypanblau-Färbung deren Lebend-Zellzahl bestimmt und die für den Test benötigte Menge in ein 15 mL Polypropylen-Röhrchen gegeben und bei 500 x g 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden mit frischem Zell-spezifischen Medium resuspendiert und auf 1×10^6 Zellen / mL eingestellt. Pro 1 mL Zellsuspension wurde 2,5 µL BATDA zugegeben und 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ bei angedrehtem Deckel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 350 x g 5 min zentrifugiert und 4 x mit je 2 mL D-PBS gewaschen, um überschüssiges BATDA aus der Suspension zu entfernen. Für die Inkubation mit Effektorzellen wurden die Zielzellen im Medium für Funktionstestungen (Tab. 2.8, S. 16) resuspendiert und auf 1×10^5 Zellen / mL eingestellt. Ein Teil der Zielzellen wurde nochmals pelletiert und der Überstand für die Fluoreszenz-Kontrolle des Mediums verwendet. Weitere Kontrollen, die bei jedem Experiment mitgeführt wurde, waren der Ansatz von Zielzellen ohne Effektorzellen zur Messung der Spontanfreisetzung von TDA und der Ansatz von Zielzellen ohne Effektorzellen

und mit Lysereagenz zur Bestimmung der maximal möglichen Freisetzung von TDA. Effektor- und Zielzellen wurden im Verhältnis 6:1, 12:1, 25:1, 50:1 und 100:1 oder 10:1, 20:1, 40:1 und 80:1, jeweils bei 5.000 oder 10.000 Zielzellen, zusammengegeben. Der Test wurde mit Volumina von 200 µL pro well in V-Bodenplatten angesetzt und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Inkubationszeiten waren abhängig von den verschiedenen Experimenten. 30 min vor Inkubationsende wurde zu den entsprechenden Ansätzen 10 µL Lysereagenz pro well zugegeben und weiter bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Ansätze kurz resuspendiert, bevor die V-Bodenplatte bei 500 x g 5 min zentrifugiert wurde. Eine Testplatte des Kits, spezielle Flachbodenplatten mit geringer Autofluoreszenz, wurde pro well mit 200 µL Europiumlösung und 20 µL Überstand aus der V-Bodenplatte beladen und 15 min bei RT unter sanftem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die entstehende Fluoreszenz im DELFIA® Fluorometer mit folgenden Bedingungen gemessen: Assay type: Counts; Blanks: 0; Unknown Replicates: 12; Sysset: Flash cycle: 1,00, Delay time: 0,40, Window time: 0,40, Dead time: 10, Emission filter: 3 (615 nm), Excitation filter: 1 (320 nm). Der Hauptfilter des Geräts hatte ein Spektrum von 290 - 360 nm.

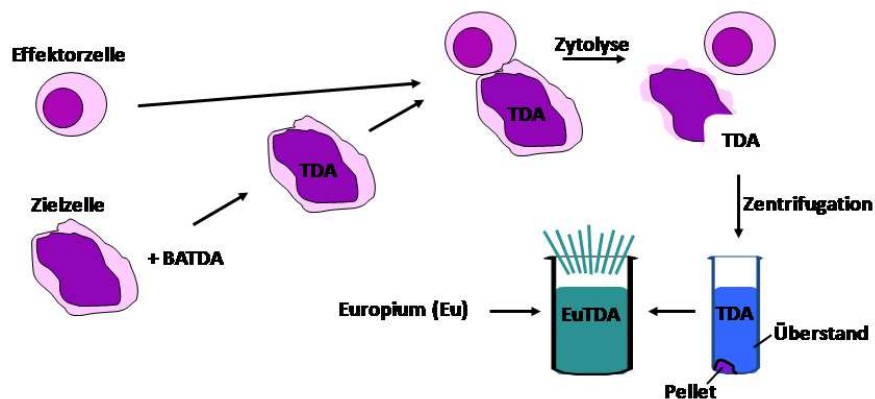


Abb. 2.3 Prinzip des DELFIA® EuTDA Cytotoxicity Assays. Zielzellen werden zunächst mit bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate (BATDA) inkubiert. Das lipophile BATDA gelangt dabei ins Zellinnere und wird in seine hydrophile Form, 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate (TDA) umgesetzt. Die so markierten Zielzellen werden nach einigen Wasch-Schritten mit Effektorzellen inkubiert. Findet zellvermittelte Zytotoxizität statt, werden die Zielzellen durch die Effektorzellen spezifisch lysiert und das TDA somit freigesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt befindet sich das TDA im Überstand. Bringt man den TDA-haltigen Überstand mit einer Europiumlösung (Eu) zusammen, entsteht messbare Fluoreszenz. Hierbei gilt: Je mehr Zellen lysiert wurden, desto höher der Gehalt an TDA und desto höher die gemessene Fluoreszenz.

2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse

Für diese Arbeit wurde aus dem breiten Anwendungsspektrum der Durchflusszytometrie die Markierung von Oberflächenantigenen zur Phänotypisierung von Zellpopulationen aus Vollblut genutzt, die hier aufgeführten Hintergrundinformationen stammen aus dem Buch "Der Experimentator - Immunologie", 3. Auflage, Kapitel 3 (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, Durchflusszytometrie, 2008). Prinzipiell wurden Zellen direkt im Vollblut mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, die Erythrozyten lysiert und die Proben

anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Die Zellen werden hier durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer gesogen und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch die Messkammer geleitet. In der Messkammer passieren die Zellen einen fokussierten Laserstrahl. Der Laserstrahl wird durch die Zelle abgelenkt, die abgehende Strahlung wird in einem optischen System aus Spiegeln und Filtern detektiert. Das Zusammenspiel von Vorwärtstreulicht (*Forward scatter* = FSC), Seitwärtstreulicht (*Side scatter* = SSC) und emittiertem Licht verschiedener Wellenlänge der eingesetzten Fluorochrome gibt Aufschluss über den Phänotyp der gemessenen Zelle. Das FSC gibt dabei Auskunft über die Größe der Zellen, das SSC über ihre Granularität. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper zur Identifizierung der Zellen über populationsspezifische Oberflächenmarker finden sich in Tab. 2.6 (S. 16). Die Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht spezifischer Wellenlänge, das über das optische System aufgetrennt wird in jeweils einem der Kanäle gemessen werden kann. Das verwendete Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma BD war mit zwei Lasern ausgestattet (Abb. 2.4), einem blauen Argonlaser (Anregungswellenlänge 488 nm) und einem roten Diodenlaser (Anregungswellenlänge ~635 nm), was die parallele Messung von vier unterschiedlichen Fluoreszenzen ermöglicht hat. Neben der dualen Lasertechnologie wurden im FACSCalibur™ folgende Filtertypen verwendet: Langpassfilter (LP, *long pass*), die nur Wellenlängen oberhalb der angegebenen definierten Wellenlänge passieren lassen; Kurzpassfilter (SP, *short pass*), die nur kurzwelliges Licht bis zur angegebenen definierten Wellenlänge passieren lassen und Bandpassfilter, die Licht nur in der angegebenen Breite um den angegebenen Mittelwert passieren lassen (Bsp.: 530/30 bedeutet einen Mittelwert von 530 nm und eine Bandbreite von 30 nm, dieser Filter lässt Licht der Wellenlänge 515 - 545 nm passieren). Durch die parallele Messung verschiedener Fluorochrome war eine Korrektur überlagernder Fluoreszenzspektren notwendig, sodass die gemessenen Wellenlängen möglichst nur durch einen Detektor registriert werden und falsch positive Signale anderer Fluorochrome kompensiert wurden. Da das Gerät und das verwendete Färbeprotokoll zu diagnostischen Routineuntersuchungen eingesetzt wurden, wurde das Gerät standardmäßig mittels Kompensationsbeads nach den im Labor optimierten Bedingungen kalibriert. Für die Kalibrierung wurden A) 1 mL Sheath Fluid mit je 1 Tropfen Kalibrierbeads unlabeled und APC-konjugiert und B) 1,5 mL Sheath Fluid mit je 1 Tropfen Kalibrierbeads unlabeled, APC-konjugiert, FITC-konjugiert, PE-konjugiert und PerCP-konjugiert versehen. Die Suspensionen wurden kurz gevortext und die Kalibrierung nach Anleitung der BD FACSComp™ software durchgeführt.

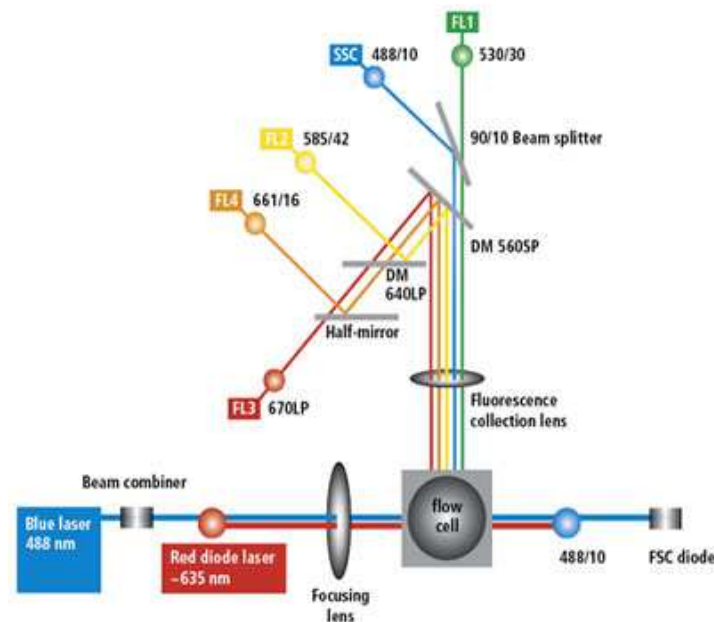


Abb. 2.4 Optisches System des Durchflusszytometers FACSCalibur™. Das System besteht aus einem Argonlaser (*Blue laser* 488 nm), einem roten Diodenlaser (*Red diode laser* ~635 nm), gefolgt von einer Fokussierungslinse (*Focusing lens*) und der Messkammer (*flow cell*). Zur Detektion enthält das System eine *Forward scatter* (FSC)-Diode, eine Sammellinse für Fluoreszenz (*Fluorescence collection lens*) und verschiedene Splitter, Spiegel, Filter und Detektoren. Zum Einsatz kommen Langpass-, Kurzpass- und Bandpassfilter, deren Eigenschaften im Text näher beschrieben sind. *Quelle:* BD Biosciences.

Für die Markierung der Standard-Oberflächenmarker von Leukozyten wurden in A) ein Röhrchen BD TruCount™ Absolute Counting Tubes 20 µL MultiTEST 3/8/45/4 plus 2µL CD14 und B) ein Flow Cytometry Röhrchen 20 µL MultiTEST 3/16+56/45/19 vorgelegt und in jedes Röhrchen 50 µL EDTA-Vollblut gegeben. Die Proben wurden gevortext und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 500 µL 1 x Lysereagenz in VE-H₂O zur Lyse der Erythrozyten zugegeben und weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden die Proben bis zur Messung bei 4°C gelagert und mit Hilfe der Software BD CellQuest Pro™ gemessen. Die TruCount-Messung wurde zur Zellzahlbestimmung durchgeführt. Es wurden immer fix 5.000 TruCount-Beads und die entsprechend in der Probe vorkommende Zahl an Zellen gemessen. Die Messung der Fluorochrome erfolgte in einem Messdokument für die vier Farben FITC, PE, APC und PerCP. Hier wurde zur Messung ein Gate auf die Leukozyten-Region gelegt und immer fix 20.000 Events gemessen. Zur Bestimmung der Populationen wurden folgende Marker verwendet: Granulozyten - CD45⁺ und eine Region bei hohem SSC (entspricht Eosinophilen und Neutrophilen), sowie eine Region bei niedrigem SSC (entspricht Basophilen); Monozyten - CD45⁺⁺CD14⁺CD3⁻ bei mittlerem SSC; Lymphozyten - CD45⁺⁺ bei geringem SSC; NK-Zellen - CD45⁺⁺CD16⁺CD56⁺CD3⁻; B-Zellen - CD45⁺⁺CD19⁺; T-Zellen - CD45⁺⁺CD3⁺ und T-Zellsubpopulationen - CD45⁺⁺CD3⁺CD4⁺ oder CD45⁺⁺CD3⁺CD8⁺. Die Auswertung erfolgte in entsprechenden optimierten Auswertedokumenten für die TruCount-Messung (Abb. 2.5 A) oder in Messdokumenten für die Vier-Farben-Messung (Abb. 2.5 B).

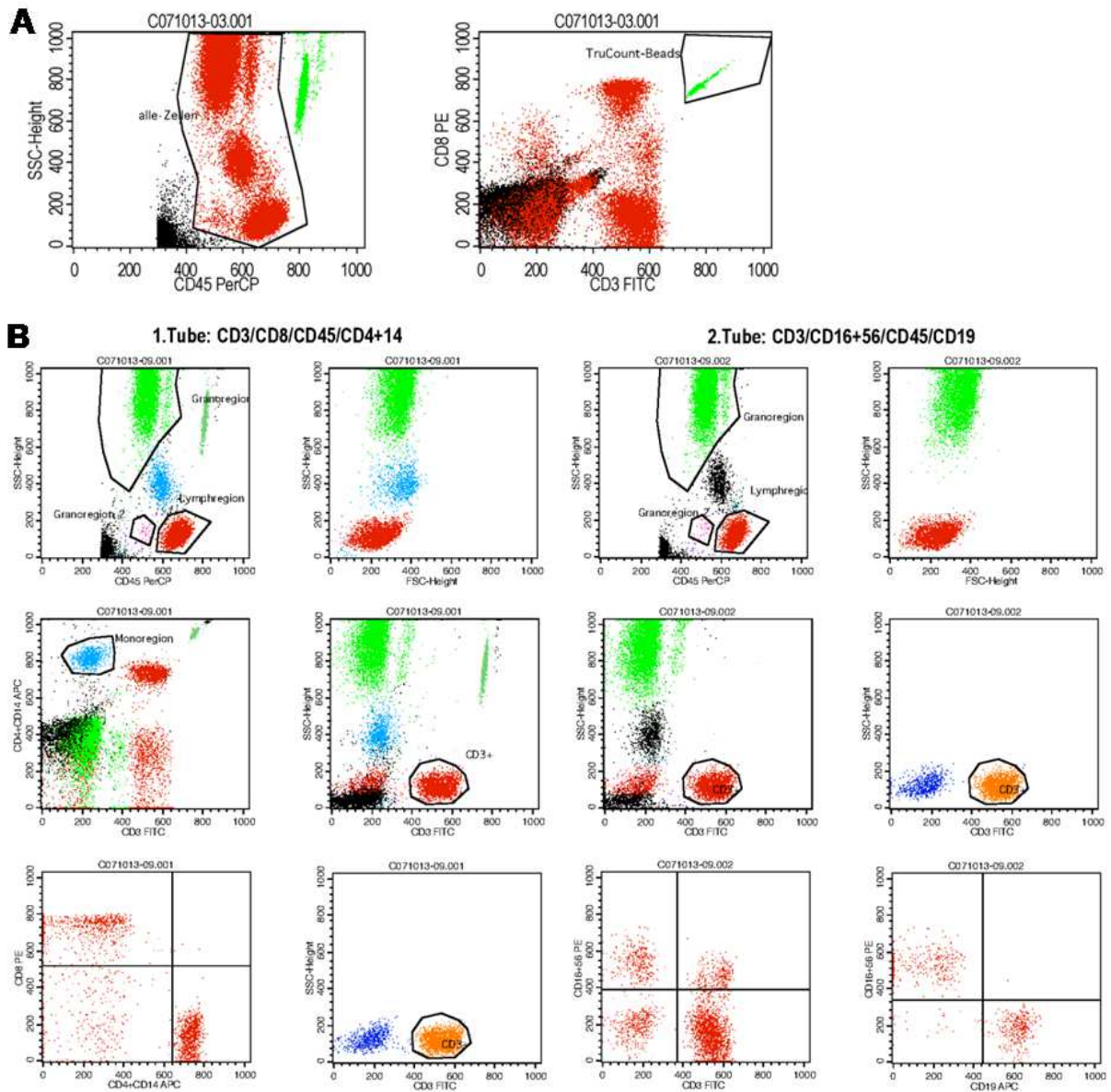


Abb. 2.5 Beispiel Auswertung der durchflusszytometrischen Populationsanalyse. A) Zellzahlbestimmung mit Hilfe von TruCount-Beads. Im Plot links wurden alle Zellen gated, rechts die TruCount-Beads. Im dargestellten Beispiel wurden bei 5.000 TruCount-Beads 31.289 Events in der Region "alle Zellen" gezählt. Dies ergab rein rechnerisch eine Zellzahl von 6.420,5 Lymphozyten pro μL Blut. **B)** Populationsbestimmung mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper über Standard-Oberflächenmarker von Leukozyten. Zur Berechnung der prozentualen Zellzahlen wurde bei beiden Röhrchen zunächst CD45 gegen die Granularität (SSC, *Side scatter*) aufgetragen. Die Darstellung der NK-Zellen ($\text{CD}45^{++}\text{CD}16^{+}\text{CD}56^{+}\text{CD}3^{-}$), der B-Zellen ($\text{CD}45^{++}\text{CD}19^{+}$) und der T-Zellen ($\text{CD}45^{++}\text{CD}3^{+}$) erfolgte aus dem Gate "Lymphregion" (rot), hier sind die $\text{CD}45^{++}$ -Zellen dargestellt. Granulozyten wurden mit Hilfe von CD45 und der Granularität bestimmt. Es ließen sich zwei Granulozyten-Regionen bestimmen, eine mit hohem SSC (Granregion 1, grün), die Eosinophile und Neutrophile beinhaltet, und eine mit niedrigem SSC (Granregion 2, pink), die die Basophilen darstellt. Die Darstellung der Monozyten ($\text{CD}45^{++}\text{CD}14^{+}\text{CD}3^{-}$, blau) erfolgte über CD3 und CD14. Die $\text{CD}4^{+}$ und $\text{CD}8^{+}$ T-Zellsubpopulationen wurden aus dem Gate "CD3+" dargestellt. Für die Darstellung der NK-Zellen wurden CD3 und CD16+56 gegeneinander aufgetragen, für die Darstellung der B-Zellen CD16+56 gegen CD19. Im dargestellten Beispiel ergab die durchgeführte Auswertung folgende prozentuale Anteile: aus der Population der Leukozyten: Granulozyten 60,59 %, Monozyten 8,96 % und Lymphozyten 30,45 %; aus der Population der Lymphozyten: B-Zellen 11,87 %, NK-Zellen 11,28 % und T-Zellen 75,94 %; die T-Zellen bestanden zu 39,82 % aus $\text{CD}4^{+}$ und zu 25,64 % aus $\text{CD}8^{+}$. Das Verhältnis von $\text{CD}4^{+}$ zu $\text{CD}8^{+}$ betrug 1,55. Die restlichen T-Zellen waren negativ auf die Marker $\text{CD}4^{+}$ und $\text{CD}8^{+}$, sie wurden für die Berechnungen nicht weiter berücksichtigt.

2.2.8. Generierung von B-Lymphoblasten-Zell-Linien (B-LCL) mittels Epstein-Barr Virus (EBV)-Transformation

Der Epstein Barr Virus (EBV)-haltige Überstand - gewonnen von der Zell-Linie B95.8 - wurde freundlicherweise vom Institut für Zelltherapeutische Forschung, Universitätsklinikum Essen unter der Leitung von Prof.in K. Fleischhauer zur Verfügung gestellt. Das verwendete Transformationsprotokoll basiert auf dem Protokoll des Instituts für Zelltherapeutische Forschung und dem im Labor von Prof.in M. Lindemann verwendeten Protokoll (Tosato & Cohen, 2007). Zur Optimierung wurde der Schritt der T-Zell-Depletion eingefügt, um die Verwendung von Cyclosporin A zu vermeiden. Für die Transformation wurden kryokonservierte MNZ, gewonnen aus Buffy Coats dreier gesunder Spender, aufgetaut und die T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellseparation depletiert. Verwendet wurde die Positiv-Fraktion bei Anwendung des Pan T Cell Isolation Kits, human (Miltenyi Biotec) (siehe Kapitel 2.2.4). Der EBV-haltige Überstand wurde langsam bei RT aufgetaut. 1 mL des Überstands und 1 mL B-LCL Medium (RPMI1640 plus 1 % Pen/Strep, 200 µg / mL L-Glutamin und 20 % HS) plus 600 IU / mL Proleukin® S und 2 µg / mL PHA wurden zu $1,5 \cdot 10^6$ Zellen der Positiv-Fraktion gegeben. Inkubiert wurde die Suspension zunächst in F-Boden 48er Zellkultur Mikroplatten bei 37°C und 5 % CO₂. Alle zwei Tage wurden die Kulturen mikroskopisch begutachtet und wenn notwendig entweder ein halber Medienwechsel oder eine Volumendopplung vorgenommen. Verwendet wurde hierfür B-LCL Medium. Da die EBV-transformierten B-LCL (*B-Lymphoblastoid Cell Lines*) aus kryokonservierten Material generiert wurden, dauerte es fünf Wochen, bis die typischen B-LCL Klone sichtbar wurden und acht Wochen, bis die Zellen stabil proliferierten. Durchflusszytometrische Analysen der Standard-Oberflächenmarker für Lymphozyten (siehe Kapitel 2.2.7) zeigten, dass es sich nach 8 Wochen Expansion bei den wachsenden Zellen um reine B-Zellkulturen handelte. Um zu analysieren, ob sich die EBV-transformierten B-LCL für die Stimulation und Expansion HPV 16-spezifischer CD8⁺ T-Zellen eigneten, wurden autologe kryokonservierte MNZ aufgetaut und nach einer 24-stündigen Ruhephase CD8⁺ T-Zellen mittels Negativisolation angereichert. Parallel dazu wurden die B-LCL mit HPV 16 E6 oder HPV 16 E7 oder Zytomegalievirus (CMV) pp65 beladen. Hierfür wurden jeweils 20 µL Peptidmixture pro 10^7 Zellen in B-LCL Medium bei $1 \cdot 10^7$ Zellen / mL für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden beladene und unbeladene B-LCL einmal mit D-PBS gewaschen und mit 30 Gy bestrahlt. Die so behandelten B-LCL wurden zur Stimulation autologer CD8⁺ T-Zellen in ELISpot-Assays zur Detektion von IFN-γ, IL-10, Granzym B und Perforin eingesetzt. Unbeladene, bestrahlte B-LCL sowie unstimulierte CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen stimuliert mit unbeladenen, bestrahlten B-LCL dienten hierbei als Negativkontrollen.

2.2.9. Expansion HPV 16-spezifischer T-Lymphozyten

Die von mir entwickelten Expansionsprotokolle für humane HPV 16-spezifische T-Zellen basierten auf einem Protokoll, das von meinem Kooperationspartner in der Forschungsabteilung der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Essen zunächst für die Expansion CMV-spezifischer Zellen entwickelt und für eine mögliche HPV 16-spezifische Expansion erweitert wurde. Als Expansionsmedium wurde in der HNO-Klinik zunächst RPMI1640 mit 200 µg / mL L-Glutamin, 1 % Pen/Strep und 5 % HS, sowie den Zytokinen IL-7, IL-15 (jeweils 10 U / mL) und IL-21 (0,3 U / mL) verwendet (basierend auf Wölfl, et al., 2011), erweitert wurde der Zytokincocktail um 200 IU / mL Proleukin®. Der Ablauf der Expansion wurde von der HNO-Klinik übernommen und beruhte prinzipiell zunächst auf der über Nacht Stimulation kryokonservierter MNZ mit je 20 µL Peptidmixin HPV 16 E6 und E7 pro 10^7 Zellen in Medium für Funktionstestungen, um unspezifische Stimulation zu vermeiden, nach Auftauen und Ruhephase (beschrieben in Kapitel 2.2.3). Nach dieser Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden - je nach Experiment - Subpopulationen der MNZ mittels magnetischer Separation angereichert (Kapitel 2.2.4). Den angereicherten Zellen wurden im Verhältnis 1:10 Zellen der mit 30 Gy bestrahlten Negativfraktion als Feeder Zellen zugesetzt und die Expansionskultur mit $2,5 \cdot 10^6$ Zellen pro cm² Kulturfläche und mL Expansionsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Zeitpunkt der in-Kulturnahme angereicherter Zellen wurde als Tag 0 bezeichnet. Alle 2,5 Tage wurde ein halber Medienwechsel vorgenommen, bei dem vorsichtig die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Expansionsmedium ersetzt wurde. Die Menge des Zytokincocktails im neuen Medium wurde so berechnet, dass die Endkonzentration in der Kultur der in Tab. 2.8 (S. 16) beschriebenen Konzentration entsprach. Nach einer Woche wurden die Zellen geerntet, wobei die Kulturgefäße mit D-PBS gespült wurden, und die Zellen bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zur Zellzahlbestimmung in D-PBS resuspendiert, anschließend erneut pelletiert und mit $4-5 \cdot 10^6$ Zellen pro mL in Medium zur Funktionstestung für eine 24-stündige Ruhephase ausgesät. Nach der Ruhephase wurden die Zellen erneut geerntet, die Zellzahl bestimmt und die Zellen wie zuvor mit Peptidmixin HPV 16 E6 und E7 stimuliert. Nach dieser Restimulation wurden die Zellen erneut geerntet, pelletiert und entsprechend der ersten Expansionsrunde erneut in Expansionsmedium inkubiert. Die zweite Expansionsrunde folgte dem Schema der ersten und je nach Experiment konnten weitere Expansionsrunden folgen oder die Expansion nach Runde 2 beendet werden. Als Expansionsmedium setzte ich den Zytokincocktail mit Proleukin® in einem speziell für die Expansion von T-Zellen entwickelten Medium, TexMACS™, ein, nachdem die Verwendung des von der HNO-Klinik eingesetzten Mediums nicht zum Wachstum HPV 16-spezifischer T-Zellen führte. Bei ausreichender Zellzahl wurden Zellen für Funktionstestungen zu den Zeitpunkten der (Re)Stimulation entnommen, genaueres ist bei den Ergebnissen der einzelnen Experimente beschrieben (Kapitel 3.3).

Für Expansionskulturen, denen artifizielle APC zugesetzt wurden, wurden Anti-Biotin MACSiBead™ Particles unter aseptischen Bedingungen nach Herstellerangaben mit biotinylierten CD3- und CD-28-Antikörpern beschichtet (Miltenyi Biotec). Hierfür wurden je 150 µL der biotinylierten Antikörper in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben, die Anti-Biotin MACSiBead™ Particles gründlich gemischt und $1 \cdot 10^8$ Partikel (500 µL) zu den Antikörpern gegeben. Das Volumen des Gemischs wurde mit D-PBS auf 1 mL erhöht und für 2 h bei 4°C unter langsamer, dreidimensionaler Rotation inkubiert. Die beladenen "Beads" wurden bei 4°C gelagert und waren bis zu 4 Monate stabil. Für den Einsatz in der Expansionskultur wurde die benötigte Menge "Beads" entnommen, 200 µL Expansionsmedium zum Waschen zugegeben und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das "Bead"-Pellet wurde in frischem Expansionsmedium resuspendiert, sodass $1 \cdot 10^6$ "Beads" 10 µL Gemisch entsprachen, und entsprechend der in Kapitel 3.3.3 und 3.3.4 angegebenen Verhältnissen den Expansionskulturen an Tag 0 zugesetzt. Zum Entfernen der "Beads" wurden die Expansionskulturen geerntet, 1 x mit D-PBS gewaschen, erneut pelletiert und mit D-PBS auf eine Dichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen pro mL eingestellt. Die Zellen wurden gut gemischt und unter weiterhin aseptischen Bedingungen 4 min in das magnetische Feld des MACSiMAG Separators (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Miltenyi Biotec) gebracht. Das Polypropylen-Röhrchen verblieb im magnetischen Feld, während der Überstand vorsichtig in ein neues Polypropylen-Röhrchen überführt wurde. Das erste Polypropylen-Röhrchen wurde aus dem magnetischen Feld entfernt und mit demselben Volumen D-PBS, wie zuvor, versehen, erneut gemischt und der Vorgang im magnetischen Feld wiederholt. Die Zahl der Zellen ohne "Beads" wurde bestimmt und die Zellen entsprechend der experimentellen Beschreibungen weiterverarbeitet.

Bei der Verwendung von TransAct Reagent als *scaffold* Reagenz waren keine Wasch-Schritte nötig, das Reagenz konnte direkt eingesetzt werden. Für die Zugabe wurde die benötigte Menge CD3-TransAct Reagent und CD28-TransAct Reagent im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend direkt den Expansionskulturen im Verhältnis 1:200, bzw. 1:500 zu $2,5 \cdot 10^6$ Zellen pro mL Kultur zugegeben. Zum Entfernen von TransAct Reagent wurden die Zellen gut gemischt, pelletiert und in frischem Medium oder D-PBS resuspendiert. Da Zentrifugationsschritte das TransAct Reagent aus der Kultur entfernten, wurde nach jeder (Re)Stimulation beim Aussäen in Expansionsmedium frisches TransAct Reagent zugegeben.

Im Folgenden sind die wichtigsten Komponenten der einzelnen Versuche zusammengefasst, um einen Überblick über die Änderungen der einzelnen Variablen pro Experiment zu geben (Tab. 2.10).

Tab. 2.10 Übersicht über die Variablen der einzelnen Expansionsexperimente

Kapitel	Ablauf	Medium	Scaffold Reagenz
3.3.1	Kryokonservierte Zellen; Isolation von T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen - Stimulation über Nacht (E6 und E7 1:1 oder CMVpp65) - Isolation von CD137 ⁺ T-Zellen	RPMI1640 mit 200 µg / mL L-Glutamin, 1 % Pen/Strep und 10 % HS; jeweils 10 U / mL IL-7 und IL-15, 0,3 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	---
3.3.2	Kryokonservierte Zellen; Stimulation über Nacht (E6 und E7 1:1) - Isolation von T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen - Isolation von CD137 ⁺ T-Zellen	TexMACS [®] mit 1 % Pen/Strep; jeweils 10 U / mL IL-7 und IL-15, 0,3 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	---
3.3.3	Kryokonservierte Zellen; Stimulation über Nacht (E6 und E7 1:1) - Isolation von T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen - Isolation von CD137 ⁺ T-Zellen	TexMACS [®] mit 1 % Pen/Strep; jeweils 10 U / mL IL-7 und IL-15, 0,3 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	"Beads" 1:2
3.3.3	Kryokonservierte Zellen; Stimulation über Nacht (E6 und E7 1:1) - Isolation von T-Zellen oder CD8 ⁺ T-Zellen - Isolation von CD137 ⁺ T-Zellen	TexMACS [®] mit 1 % Pen/Strep; jeweils 10 U / mL IL-7 und IL-15, 0,3 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	"Beads" 1:2; inkl. Entfernung der "Beads"
3.3.3	Kryokonservierte Zellen; Stimulation über Nacht (E6 und E7 1:1) - Isolation von CD8 ⁺ und CD137 ⁺ T-Zellen	TexMACS [®] mit 1 % Pen/Strep; 10 U / mL IL-7, 10 oder 20 U / mL IL-15, 0,3 oder 0,6 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	Keine "Beads" oder "Beads" 1:2 oder "Beads" 1:5; kein Entfernen der "Beads" (falls zugesetzt)
3.3.3	Frisch isolierte Zellen; Stimulation über Nacht (E6 und E7 1:1) - Isolation von CD8 ⁺ und CD137 ⁺ T-Zellen	TexMACS [®] mit 1 % Pen/Strep; 10 U / mL IL-7, 20 U / mL IL-15, 0,6 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	"Beads" 1:2; inkl. Entfernung der "Beads"
3.3.4	Frisch isolierte Zellen; Stimulation über Nacht (E6 oder E7) - Isolation von CD8 ⁺ T-Zellen	TexMACS [®] mit 1 % Pen/Strep; 10 U / mL IL-7, 20 U / mL IL-15, 0,6 U / mL IL-21 und 200 IU / mL Proleukin [®]	"Beads" 1:2 oder 1:5, TransAct 1:200 oder 1:500; inkl. Entfernung der "Beads"

2.2.10. Statistische Analysen

Die Berechnungen aller Werte wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind als Mediane mit Interquartilsabständen („*Interquartile Ranges*“ = IQR) angegeben. Das Niveau der Signifikanzen wurde mit dem zweiseitig gepaarten Mann-Whitney-Test berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden folgendermaßen unter Angabe des genauen P-Werts in den Abbildungen gekennzeichnet: * bei $P < 0,05$; ** bei $P < 0,005$; *** bei $P < 0,0005$. Die Berechnung der Korrelation erfolgte unter Verwendung des Spearman Korrelationskoeffizienten r . Berechnete Koeffizienten mit $r < -0,500$, bzw. $r > 0,500$ wurden per Definition als korrelierend bewertet.

3. Ergebnisse

Zur Heilung verschiedener Tumorarten wird die Entwicklung neuartiger Therapieansätze seit einigen Jahren stark vorangetrieben. Eine dieser Therapiemöglichkeiten ist die gerichtete Anwendung humaner Lymphozyten, beispielsweise in einem adaptiven T-Zelltransfer. Für die Behandlung HPV-positiver Kopf-Hals-Tumore ist diese Art Therapie sehr gut geeignet, da einzig Tumorzellen die viralen Onkogene E6 und E7 tragen und somit ein optimales Angriffsziel für spezifisch reagierende T-Zellen bieten. In dieser Arbeit soll nun beschrieben werden, ob ein autologer Therapieansatz mit HPV 16-spezifischen T-Zellen, die aus peripherem Blut von Patienten mit HPV 16-positiven Kopf-Hals-Tumoren gewonnen werden, unter möglichst GMP-konformen Bedingungen möglich ist. Für eine solche zellbasierte Immuntherapie ist die Zahl an funktional aktiven Zellen ausschlaggebend, weshalb eine Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen unabdingbar ist. Bevor das Augenmerk auf den Prozess der Expansion gerichtet werden konnte, war es jedoch zunächst nötig, eine Plattform zur Charakterisierung der HPV 16-spezifischen T-Zellen zu schaffen. Hierfür habe ich meine Arbeit auf eine Kombination an Testen fokussiert, mit denen gleichzeitig die Spezifität und Funktionalität der Zellen untersucht werden kann. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellmarker wurde von meinem Kooperationspartner in der Forschungsabteilung der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Essen etabliert und optimiert und ist somit nicht Gegenstand dieser Arbeit. Als spezifisch und funktionsfähig ließen sich Lymphozyten definieren, die sich durch Peptidpools der Onkogene von HPV 16, E6 und E7, aktivieren ließen und daraufhin Zytokine und zytolytische Proteine sezernierten. Dies konnte erfolgreich im ELISpot-Verfahren ermittelt werden (siehe 3.1.1). Als weiteren Test zur Ermittlung der Spezifität und Funktionalität wurde die Messung der zytolytischen Aktivität eingesetzt. Hierfür wurde der Zytotoxizitätstest EuTDA-Assay etabliert und erfolgreich für Zell-Linien optimiert, die aus einem HPV 16-positiven und - zum Vergleich - aus einem HPV 16-negativen Tumor stammten (siehe 3.1.2). Auf Grund von limitiertem Material von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wurde die Etablierung und Optimierung der Tests und die Entwicklung der Expansionsprotokolle in meinen Händen mit mononukleären Zellen aus gesunden Spendern durchgeführt. Diese Strategie erlaubte mir außerdem, eine Aussage über die HPV 16-spezifische Immunität in gesunden Spendern jeglicher Altersstufe zu treffen. Im Rahmen der Studie "Immunität gegenüber humanem Papillomavirus (HPV) bei geimpften und ungeimpften Probanden" wurde außerdem die Immunität in entsprechend geimpften und ungeimpften Freiwilligen gegen die Onkogene HPV 16 E6 und E7 mittels optimierten ELISpot-Analysen untersucht (siehe 3.2). Dies erfolgte insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob sich bei geimpften Spendern mehr HPV 16-spezifische Zellen finden ließen als bei ungeimpften. In diesem Fall wären Zellen HPV-geimpfter Spender besonders für die Entwicklung eines Expansionsprotokolls HPV 16-spezifischer Zellen geeignet.

3.1. Assay-Optimierung

3.1.1. ELISpot (Enzyme-Linked-Immunospot)

Bereits in den 1980er Jahre wurde der ELISpot entwickelt, um die Sekretion von Zytokinen auf Einzelzellniveau zu messen (Czerkinsky, Nilsson, Nygren, Ouchterlony, & Tarkowski, 1983; Czerkinsky, Andersson, Ekre, Nilsson, Klareskog, & Ouchterlony, 1988; Taguchi, et al., 1990). Obwohl heutzutage sehr viele verschiedene Zytokine und zytotoxische Substanzen gemessen werden können, ist die Messung von Interferon (IFN)- γ zur Darstellung einer Th1-typischen Immunantwort nach Applikation verschiedener Stimulanzien häufig das Mittel der Wahl. Es wurden über die Jahre viele verschiedene Protokolle entwickelt (Britten, et al., 2008; Janetzki, Hoos, Melief, Odunsi, Romero, & Britten, 2013; Lindemann, Böhmer, Zabel, & Grosse-Wilde, 2003; Malyguine, Strobl, Dunham, Shurin, & Sayers, 2012; Mander, et al., 2010; Shafer-Weaver, et al., 2003), da die gemessenen Immunantworten so zahlreich wie die verschiedenen zu Grunde gelegten Fragestellungen sind, und die einzelnen Komponenten des Assays einen großen Einfluss auf das Messergebnis haben (Janetzki, Hoos, Melief, Odunsi, Romero, & Britten, 2013). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit einzelne Komponenten eines im Labor von Professorin Lindemann entwickelten ELISpot-Protokolls für die Fragestellung dieses Projekts optimiert. Durch die Verwendung von MultiScreen-Platten mit PVDF-Filtern (MAIPN4550, Merck Millipore) waren die durchgeführten Messungen sehr empfindlich, sodass sich auch schwache Reaktionen gut messen ließen. In meiner Arbeit habe ich folgende Punkte zur Messung HPV 16-spezifischer Reaktionen optimiert:

- Vorinkubation isolierter mononukleärer Zellen (MNZ) mit Antigen-Peptiden (Abb. 3.1, S. 36)
- Medium (Abb. 3.2, S. 37)
- Zellzahlen (Abb. 3.3, S. 39, und Tab. 3.1, S. 38).

Sofern nicht anderweitig beschrieben, wurden alle Experimente unabhängig voneinander mit frisch isolierten MNZ von drei gesunden Spendern durchgeführt. Vergleichsexperimente wurden hierbei stets parallel angesetzt. Die Vorinkubation isolierter MNZ fand in 96-well Platten statt. Hier stehen jedoch verschieden geformte Böden zur Verfügung: Flachbodenplatten, Rundbodenplatten (U-Platten) und Spitzbodenplatten (V-Platten). MNZ benötigen einen relativ engen Kontakt, um analytisch schlüssig auf einen Stimulus zu reagieren. Hierfür spielen sowohl die Zellzahl, als auch die Enge der Platte eine große Rolle, wie in Abb. 3.1 deutlich wird. Mit zunehmender Zellzahl wurde die Dichte der Zellen pro cm^2 in beiden getesteten Plattentypen größer, sodass unstimulierte MNZ bereits auf Grund des engen Kontakts zu anderen MNZ mit der unspezifischen Sekretion von IFN- γ reagierten. Je größer die Zelldichte war, desto höher fiel der unstimulierte Wert der Negativkontrolle aus. Die Werte für die gleichen Zellzahlen in den unterschiedlichen Platten waren nicht signifikant verschieden (Mann-Whitney-Test). Da die Negativkontrolle möglichst wenig unspezifische Reaktion zeigen sollte, wurde die Vorinkubation in U-Platten der Inkubation in V-Platten

vorgezogen, da hier sowohl die medianen Werte als auch die Abweichung der einzelnen Werte voneinander geringer waren.

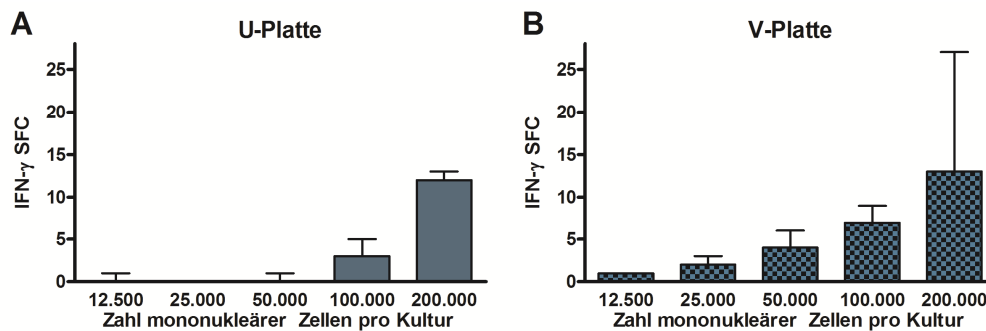


Abb. 3.1 Vergleich der Vorinkubation in A) Rundboden (U)- vs. B) Spitzboden (V)-Platten. In $N = 3$ unabhängigen Testen wurde die Vorinkubation in den unterschiedlichen Plattentypen getestet. Isolierte mononukleäre Zellengesunder Spender wurden parallel in U- und V-Platten über Nacht vorinkubiert, bevor sie nach demselben Protokoll im ELISpot-Assay weiterverarbeitet wurden. Gemessen wurde die Sekretion an IFN- γ durch unstimulierte mononukleäre Zellen (IFN- γ Spot Forming Cells (SFC)) bei unterschiedlicher Zellzahl pro Kultur. Dargestellt sind die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*). Je höher die Zellzahl und je spitzer die Platte, desto größer war die Dichte der Zellen pro cm^2 . Eine größere Dichte führte zu mehr zählbaren Spots, d.h. je größer die Zelldichte, desto mehr Zellen reagierten auch ohne Stimulus mit unspezifischer Sekretion von IFN- γ . Da eine unspezifische Reaktion weitestgehend vermieden werden sollte, wurde die Vorinkubation in U-Platten der Inkubation in V-Platten vorgezogen.

Es ist bekannt, dass die eingesetzten Komponenten eines Mediums ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktivität der Zellen haben (Mander, et al., 2010), weshalb ich für diese Arbeit die Reaktivität frisch isolierter MNZ in drei verschiedene Medien verglichen habe (Abb. 3.2). Die genaue Zusammensetzung der Medien ist in Kapitel 2.1.3 (S. 16) beschrieben. Zum einen wurde ein herkömmliches Medium mit 10% Humanserum (10% HS) verglichen mit einem herkömmlichen Serum-freien Medium (AIMV) und einem Medium, das speziell für die Expansion von T-Zellen entwickelt wurde (TexMACSTM). Die MNZ wurden direkt nach Isolation in die verschiedenen Medien gegeben und verblieben die gesamte Inkubationszeit in diesem Medium. Die Medianwerte aus zwölf Experimenten mit zwölf verschiedenen gesunden Spendern für die spezifische Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit HPV 16 E6 (Abb. 3.2 B) oder HPV16 E7 (Abb. 3.2 C) unterschieden sich bei allen drei Medien nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney-Test), obgleich die Streuung bei Inkubation in AIMV eine größere Spanne umfasste, als bei 10% HS und TexMACSTM. Deutliche Unterschiede waren jedoch in den Negativkontrollen sichtbar (Abb. 3.2 A), die geringste Streuung und der insgesamt geringste Medianwert für die Sekretion von IFN- γ fand sich bei Inkubation mit dem 10% HS-Medium. Die Sekretion von IFN- γ in Kulturen mit AIMV und TexMACSTM unterschied sich wiederum nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney-Test). Signifikant verschieden war jedoch die IFN- γ Sekretion in Kulturen mit TexMACS und mit 10% HS ($P < 0,005$, Mann-Whitney-Test) sowie mit AIMV und mit 10% HS ($P < 0,0005$, Mann-Whitney-Test). Um eine Verfälschung der Reaktionen durch unspezifische Reaktionen möglichst gering zu halten, wurde als Testmedium das 10% HS-Medium gewählt.

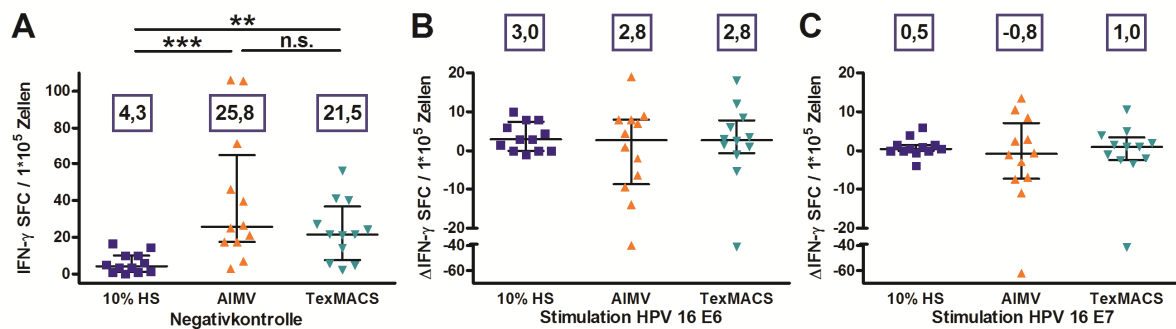


Abb. 3.2 Inkubation mononukleärer Zellen in verschiedenen Medien im ELISpot-Assay. Mit isolierten mononukleären Zellen von zwölf gesunden Spendern wurden parallel ELISpot-Assays in verschiedenen Medien angesetzt: ein Medium mit Humanserum (10% HS), ein serumfreies Medium (AIMV) und ein Medium speziell entwickelt für die Expansion von T-Zellen (TexMACS). In den Scatter Plots der IFN-γ sezernierenden *Spot Forming Cells* (SFC) sind die Medianwerte mit IQR (*Interquartile Ranges*) pro 100.000 Zellen dargestellt. Die gerahmten Zahlen geben den Median der entsprechenden Testgruppe an. Die Medianwerte der spezifischen Sekretion von IFN-γ nach Stimulation mit Peptidpools von HPV 16 E6 (**B**) oder HPV 16 E7 (**C**) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Inkubationen in den verschiedenen Medien. Die Streuung der zu messenden Spots war bei Inkubation in AIMV oder TexMACSTM größer als bei Inkubation in 10% HS. Die Werte der unstimulierten und damit unspezifisch reagierenden Negativkontrolle (**A**) unterschieden sich sehr deutlich voneinander. Der Medianwert der Inkubation mononukleärer Zellen in 10% HS-Medium unterschied sich signifikant von dem der Inkubation in TexMACSTM ($P < 0,005$), bzw. sehr signifikant von dem der Inkubation in AIMV ($P < 0,0005$, Mann-Whitney-Test). Da die Negativkontrollen bei Inkubation in 10% HS-Medium am geringsten waren, wurde dieses Medium für weitere Funktionstestungen ausgewählt.

Wie bereits erwähnt, eignet sich der ELISpot-Assay sehr gut zur Messung sezernierter Zytokine (Janetzki, Hoos, Melief, Odunsi, Romero, & Britten, 2013; Lindemann, Böhmer, Zabel, & Grosse-Wilde, 2003; Mander, et al., 2010), aber auch die Messung sezernierter zytotoxischer Proteine findet immer mehr Beachtung (Malyguine, Strobl, Dunham, Shurin, & Sayers, 2012; Nowacki, Bettenworth, Ross, Heidemann, Lehmann, & Lügering, 2012; Shafer-Weaver, et al., 2003). Um die Plattform zur Charakterisierung der Reaktionen auf Stimulation mit HPV 16 E6 oder HPV 16 E7 zu erweitern, wurde aus diesem Grund neben IFN-γ noch die Messung zytotoxischer Reaktionen im ELISpot-Assay durch Sekretion von Granzym B und Perforin nach Peptidstimulation etabliert und optimiert. Da in den ersten Bereichen der Optimierung bereits sichtbar war, dass die spezifische IFN-γ Sekretion nach Stimulation mit HPV 16 E6 und HPV 16 E7 in gesunden Spendern nur sehr schwach ausfiel, wurde außerdem die Detektion der Sekretion von Interleukin (IL)-10 optimiert, um festzustellen, ob die Peptidstimulation eher zu einer herunter regulierenden Immunantwort führt - statt zu einer Th1-gerichteten Immunantwort über Sekretion von IFN-γ, wie zuvor angenommen. Da die Spots für die verschiedenen Zytokine und zytotoxischen Proteine sehr unterschiedlich beschaffen waren (Abb. 3.4) und die Zahl an eingesetzten MNZ pro Kultur einen großen Einfluss auf die Zahl an detektierbaren Spots hatte (Abb. 3.3), wurde die Zellzahl pro Kultur für die Detektion von IFN-γ, Granzym B, Perforin und IL-10 jeweils austitriert. Die Zahl an MNZ, die das günstigste Verhältnis zwischen Negativkontrolle und spezifisch stimulierten MNZ ergab, wurde hierbei als optimale Zahl erachtet. Für IFN-γ wurde

die Titration im Bereich von 400.000 bis 100.000 Zellen pro Kultur durchgeführt, für Granzym B, Perforin und IL-10 jeweils im Bereich von 100.000 bis 25.000 Zellen pro Kultur. In Tab. 3.1 sind die einzelnen Häufigkeiten, wie oft eine Zellzahl pro Kultur das günstigste Verhältnis zwischen den Medianen der Negativkontrollen und der stimulierten Werten ergab, prozentual dargestellt. Pro Zytokin / zytotoxischem Protein wurden 16 - 24 Versuche durchgeführt.

Die Einzelergebnisse sind im Anhang in den Tab. 6.1 (S. 91) bis Tab. 6.4 (S. 94) zu finden.

Nachstehend die Zahlen an MNZ pro Kultur, die als optimal für die Detektion an HPV 16 E6- und HPV 16 E7-spezifischen Zellen in gesunden Spender errechnet wurden: IFN- γ 100.000, Granzym B 50.000, Perforin und IL-10 jeweils 25.000 Zellen.

Tab. 3.1 Prozentuale Häufigkeiten des optimalen Verhältnisses zwischen Negativkontrolle und spezifisch stimulierten mononukleären Zellen

MNZ / Kultur	IFN- γ	IL-10	Granzym B	Perforin
400.000	22,7 %	---	---	---
200.000	13,6 %	---	---	---
100.000	63,6 %	8,3 %	24,0 %	6,3 %
50.000	---	37,5 %	40,0 %	6,3 %
25.000	---	54,2 %	36,0 %	87,5 %

Dargestellt ist, wie häufig innerhalb der jeweiligen Zellzahl-Titration eine Zellzahl das günstigste Verhältnis von Negativkontrolle zu spezifisch stimulierten mononukleären Zellen (MNZ) ergab. Für das jeweilige zu detektierende Zytokin bzw. zytotoxische Protein ist die optimale Zellzahl fett dargestellt, Einzelergebnisse sind im Anhang, Tab. 6.1 (S. 91) bis Tab. 6.4 (S. 94) zu finden. Folgende Anzahl Experimente wurden durchgeführt: IFN- γ : 22 (14 Ansätze mit HPV 16 E6 , 12 mit HPV 16 E7; 2 Ansätze mit HPV 16 E7 führten zu keiner eindeutig optimal Zellzahl pro Kultur und wurden aus diesen Gründen nicht für die Berechnung berücksichtigt); IL-10: 24 (jeweils 12 Ansätze mit HPV 16 E6 und HPV 16 E7); Granzym B: 25 (13 Ansätze mit HPV 16 E6 , 12 mit HPV 16 E7; bei einem Ansatz mit HPV 16 E7 ergab sich keine eindeutig optimal Zellzahl pro Kultur, der Ansatz wurde aus diesen Gründen nicht für die Berechnung berücksichtigt); Perforin: 16 (jeweils 8 Ansätze mit HPV 16 E6 und HPV 16 E7).

Damit ergab sich folgendes optimierte Protokoll für die Testung der Spezifität und Funktionalität von frisch isolierten MNZ gesunder Spender im ELISpot-Assay auf PFVD-Platten:

- Medium RPMI1640 + 10 % Humanserum
- Vorinkubation über Nacht in U-Platten
- MNZ pro Kultur in Abhängigkeit des zu detektierenden Zytokins oder zytotoxischen Proteins 25.000 (IL-10, Perforin), 50.000 (Granzym B) oder 100.000 (IFN- γ).

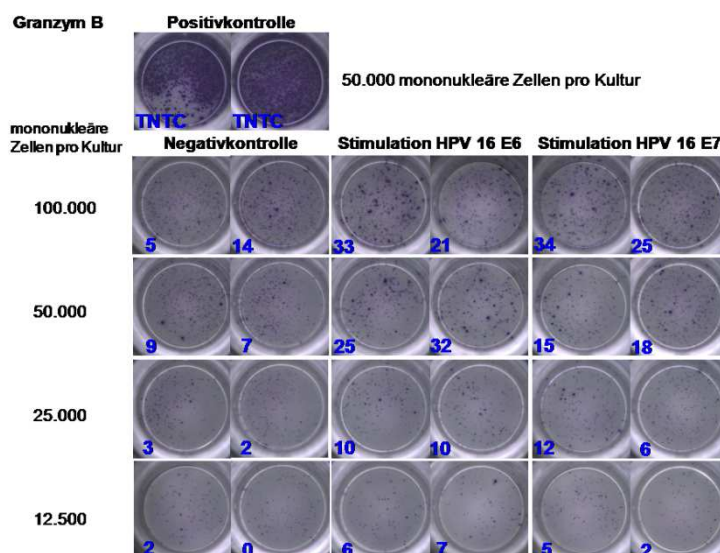


Abb. 3.3 Titrationsbeispiel für die Detektion von sezerniertem Granzym B. Gezeigt werden die Doppelansätze des ELISpot-Assays eines gesunden Spenders. Der Wert der Negativkontrolle steigt mit zunehmender Zahl an mononukleären Zellen. Auch die messbare Zahl an Spots stimulierter Zellen steigt, jedoch ist das Verhältnis von Negativkontrolle zu stimulierten Werten von Zellzahl zu Zellzahl verschieden, sodass die optimale Zahl mononukleärer Zellen pro Kultur ausgetitriert werden musste. TNTC: *too numerous to count*.

In Abb. 3.4 sind Beispiele von optimierten ELISpot-Assays der MNZ gesunder Spendern zu sehen, die entweder gegen HPV geimpft (B) oder nicht geimpft (A) sind. Für beide Probandengruppen ließ sich dasselbe optimierte Protokoll anwenden (siehe Kapitel 3.2).

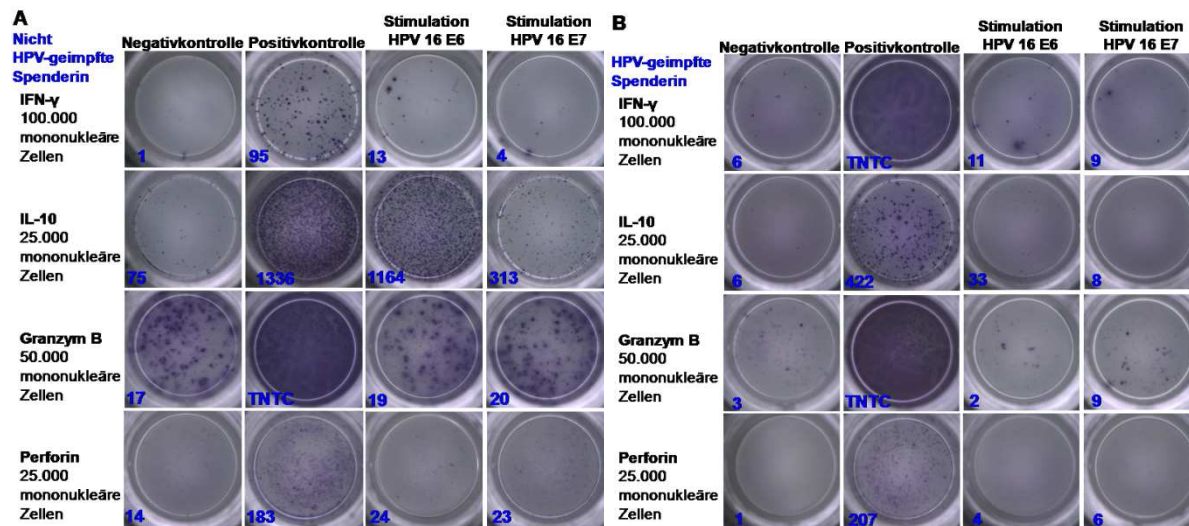


Abb. 3.4 Detektionsbeispiele für IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin mit optimiertem ELISpot-Protokoll. In den Beispielen sind die Tests von mononukleären Zellen gesunder Spenderinnen, die gegen HPV geimpft (B) oder nicht geimpft (A) sind, dargestellt. Für beide Probandengruppen eignete sich das optimierte ELISpot-Protokoll mit den jeweiligen optimierten Zellzahlen pro Kultur für IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin. Deutlich sichtbar war die unterschiedliche Beschaffenheit der Spots für verschiedene sekretierte Zytokine bzw. zytotoxischen Proteine. TNTC: *too numerous to count*.

3.1.2. Zytotoxizitätstest

Ziel einer gerichteten Tumotherapie ist das Erkennen und Eliminieren der Tumorzellen. Während mit dem ELISpot-Verfahren die spezifische Reaktivität von MNZ nachgewiesen

werden kann, wird in einem Zytotoxizitätstest die aktive Eliminierung von Zielzellen durch zytotoxische Lymphozyten dargestellt. Das heißt, als erstes Indiz für zytotoxische Aktivität nach Stimulation eignet sich durchaus die Messung der Sekretion von Granzym B oder auch Perforin im ELISpot-Assay, aber eine tatsächlich erfolgte Induktion der Apoptose durch zellvermittelte Zytotoxizität lässt sich erst durch den Nachweis eines spezifischen Angriffs auf Zielzellen nachweisen. Charakteristisch für sterbende Zellen ist eine defekte Plasmamembran (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, Zellvermittelte Cytotoxizität, 2008). Eine defekte Plasmamembran lässt sich bereits mit der Färbung von Trypanblau nachweisen, allerdings kann hierbei nur schwer nachgewiesen werden, dass es sich bei einer angefärbten Zelle um die gewünschte Zielzelle handelt. Deshalb basiert der Nachweis zellvermittelter Zytotoxizität auf der Freisetzung einer Substanz, die zuvor spezifisch in die Zielzellen eingebracht wurde und erst durch Zerstörung der Plasmamembran wieder freigesetzt wird. Der klassische Zytotoxizitätstest ist der bereits 1974 entwickelte ^{51}Cr -Release Assay (Dunkley, Miller, & Shortman, 1974), bei dem die Freisetzung von radioaktivem Chrom (^{51}Cr) nachgewiesen wird. Ein weniger aufwändiger, kostengünstiger und nicht radioaktiver Test ist das kommerziell erhältliche DELFIA[®] cell cytotoxicity kit (das Kit "DELFIA[®] EuTDA Cytotoxicity Reagents"), kurz EuTDA-Assay. Ich habe diesen Test zunächst nach Herstellerangaben erfolgreich als NK (natürliche Killerzellen)-Zell-Assay etabliert (Abb. 3.5) und anschließend für die Bedürfnisse der Testung von T-Zell-vermittelter Toxizität HPV 16-spezifischer T-Zellen optimiert (Abb. 3.6 bis Abb. 3.8).

Für die Etablierung des EuTDA-Assays wurde als Zielzelle die Zell-Linie K562 gewählt. K562 ist eine leukämische Zell-Linie, die dafür bekannt ist, sehr empfindlich in NK-Zell-Assays zu reagieren (ATCC). Als Effektorzellen wurden frisch isolierte MNZ eingesetzt. Dieser experimentelle Aufbau war ein NK-Zell-Assay, da zum einen die MNZ unstimuliert in die Experimente gegeben wurden und zum anderen die Zielzellen typischerweise nur wenig oder keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren (Koeffler & Golde, 1980; Leibniz-Institut DSMZ). Somit reagierten als erstes die vorhandenen NK-Zellen. In sechs unabhängigen Experimenten wurde eine Ratio von Effektorzellen (EC, *effector cells*) zu Zielzellen (TC, *target cells*) zwischen 6:1 bis 100:1 mit 5.000 oder 10.000 Zielzellen bei einer Inkubationszeit von 2,5 h in V-Platten getestet (Abb. 3.5 A). Bei steigender Zahl Effektorzellen war sowohl bei 5.000 als auch 10.000 Zielzellen ein deutlicher Anstieg der prozentualen spezifischen Freisetzung von 4 % bis 25 % (5.000 TC), bzw. 7 % bis 30 % (10.000 TC) messbar, wobei der einzige signifikant verschiedene Anstieg beim Verhältnis von 50:1 zu 100:1 und 5.000 Zielzellen messbar war ($P = 0,03$, Mann-Whitney-Test). Berechnet wurde die prozentuale spezifische Freisetzung folgendermaßen:

$$\% \text{ Spezifische Freisetzung} = \frac{\text{normierterProbenwert} - \text{normierteSpontanfreisetzung}}{\text{normiertemaximaleFreisetzung} - \text{normierteSpontanfreisetzung}} * 100$$

Normiert wurden die Werte gegen die jeweils mitgeführte Medienkontrolle (Hintergrundfluoreszenz). Der günstigste Zeitraum für die Inkubationszeit von Effektor- und Zielzellen wurde in fünf unabhängigen Kinetik-Experimenten festgelegt (Abb. 3.5 B - D). Hierfür wurden parallel Tests mit 5.000 oder 10.000 Zielzellen und Verhältnissen von 6:1 bis 100:1 angesetzt und nach 1,5 h, 3 h oder über Nacht Inkubation beendet und detektiert. Während ein Zeitraum von 1,5 h zu einem instabilen Anstieg über die steigende Effektorzellzahl hinweg führte (Abb. 3.5 B), ergaben sich bei der Inkubation über Nacht Prozentzahlen > 100 % für die spezifische Freisetzung (Abb. 3.5 D). Es ließ sich feststellen, dass die gemessenen Fluoreszenzwerte der Spontanfreisetzung und der maximalen Freisetzung nach Zell-Lyse ähnlich hoch waren, was bedeutet, dass nach einer über Nacht Inkubation der Ligand nicht mehr stabil in den Zellen vorlag. Die Kurve der 3 h Inkubationszeit (Abb. 3.5 C) verlief stabil, stetig steigend und insgesamt mit deutlich höheren Prozentzahlen, als die 2,5 h Inkubationszeit (Abb. 3.5 A). Sowohl für 5.000 als auch für 10.000 Zielzellen lag die prozentuale spezifische Freisetzung von TDA bei einem Verhältnis von 50:1 deutlich über 80 %. Somit wurde die Inkubationszeit von Effektor- und Zielzellen von 3 h als optimal erachtet.

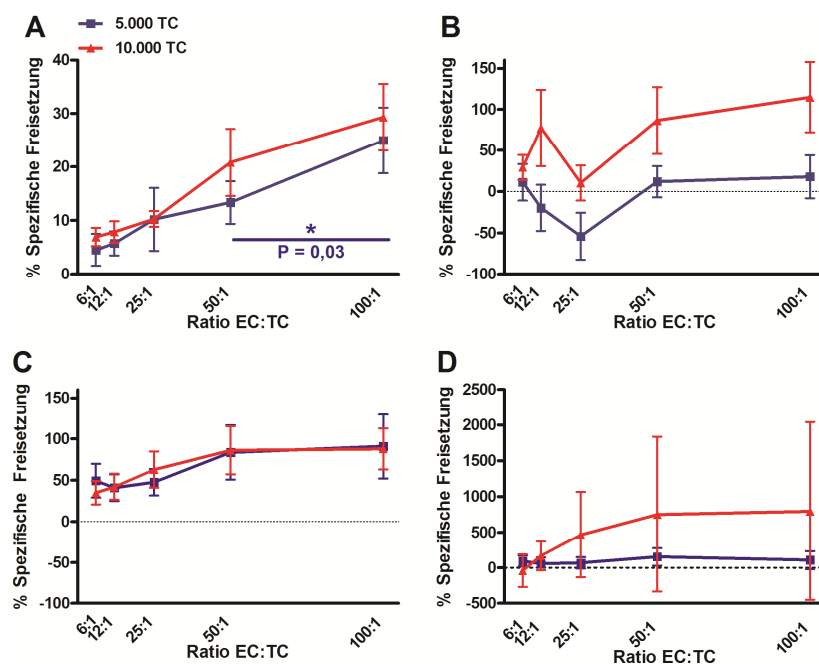


Abb. 3.5 DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest als NK-Zell-Assay. Dargestellt sind die Medianwerte mit IQR (*Interquartile Ranges*) der prozentualen spezifischen Freisetzung von TDA (2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-diacarboxylate) aus N = 6 (**A**), bzw. N = 5 (**B** - **D**) unabhängigen Experimenten. Die Ratio für Effektor- zu Zielzellen lag im Bereich von 6:1 bis 100:1 bei jeweils 5.000 (blau) und 10.000 (rot) Zielzellen. Als Zielzellen (TC, *target cells*) wurden K562, als Effektorzellen (EC, *effector cells*) frisch isolierte, unstimulierte mononukleäre Zellen verwendet. **A**) Etablierung des Tests mit einem Inkubationszeitraum von Effektor- und Zielzellen von 2,5 h. Der einzig signifikante Anstieg erfolgte bei dem Verhältnis von 50:1 zu 100:1 für 5.000 Zielzellen ($P = 0,03$, Mann-Whitney-Test), wobei für beide eingesetzte Mengen Zielzellen ein kontinuierlicher Anstieg der prozentualen spezifischen Freisetzung bei zunehmender Zahl Effektorzellen messbar war. **B** - **D**) Kinetik der optimalen Inkubationszeit von Effektor- und Zielzellen. **B**) Eine Inkubationszeit von 1,5 h von Effektor- mit Zielzellen führte bei niedrigen Verhältnissen and Effektor- zu Zielzellen zu einem instabilem Anstieg der spezifischen Freisetzung von TDA. Bei 5.000 Zielzellen blieb die prozentuale spezifische Freisetzung außerdem

auch bei Verhältnis von 100:1 von Effektor- zu Zielzellen sehr niedrig (<20%). **C)** Eine gemeinsame Inkubation der Ziel- und Effektorzellen von 3 h wurde als optimal erachtet, da hier der Anstieg der spezifischen TDA-Freisetzung bei zunehmender Effektorzellzahl vor allem bei 10.000 Zielzellen sehr stabil verlief und bezüglich der Prozentzahlen deutlich über denen der 2,5 h Inkubation lag. **D)** Gemeinsame Inkubation von Ziel- und Effektorzellen über Nacht führte zu sehr hohen, wenig plausiblen Prozentzahlen (> 100 %).

Da es sich bei den K562 um Suspensionszellen handelt, wurde der Test im nächsten Schritt für adhären wachsende Zell-Linien von Kopf-Hals-Tumoren optimiert. Die beiden Zell-Linien, UPCI-SCC-090 (HPV 16 positiv) und UT-SCC-050 (HPV 16 negativ), wurden freundlicherweise von Forschungsabteilung der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Essen im Rahmen der Kooperation zu Verfügung gestellt. An den Δ Fluoreszenz-Werten - berechnet aus der Differenz der Spontan- und maximalen Freisetzung - aus sechs unabhängigen Experimenten ließ sich erkennen, dass sich - besonders für 10.000 Zellen - bei einer Inkubationszeit von 3 h ein breiter Messbereich für die spezifische Fluoreszenz ergab (Abb. 3.6 und Tab. 3.2).

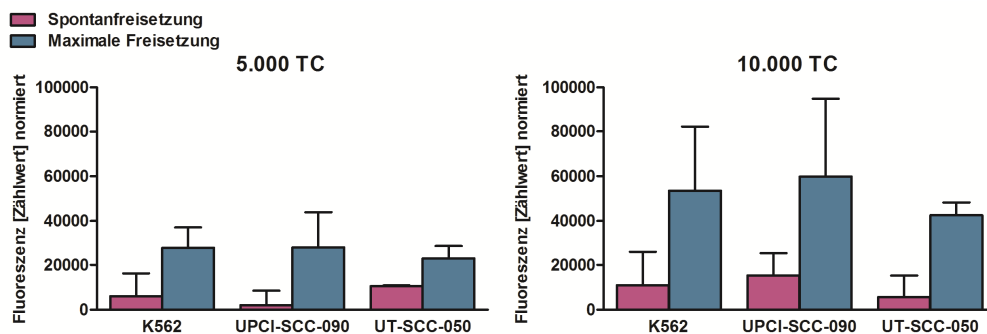


Abb. 3.6 Vergleich verschiedener Zell-Linien im DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest. Adhären te Zell-Linien etabliert aus Kopf-Hals-Tumoren (UPCI-SCC-090 und UT-SCC-050) ließen sich ebenso gut im Zytotoxizitätstest einsetzen, wie die Suspensionszell-Linie K562. Die Zell-Linien sind HPV 16 positiv (UPCI-SCC-090) bzw. HPV 16 negativ (UT-SCC-050) und sollen dem Nachweis HPV 16-spezifischer zellvermittelter Zytotoxizität dienen. Besonders für 10.000 Zielzellen (TC, *target cells*) ergab sich ein großer Bereich für die Δ Fluoreszenz (siehe Tab. 3.2), in dem die spezifische Freisetzung optimal messen ließe. N = 6, Inkubationszeit: 3 h in V-Platten. Dargestellt sind mediane Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*).

Tab. 3.2 Fluoreszenzwerte des Vergleichs verschiedener Zell-Linien im DELIFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest

Δ Fluoreszenz	K562	UPCI-SCC-090	UT-SCC-050
5.000 Zielzellen	21.471	25.638	12.349
10.000 Zielzellen	42.546	44.489	36.794

Δ Fluoreszenz der in Abb. 3.8 gezeigten Graphen. Δ Fluoreszenz berechnete sich aus der Differenz der Spontan- und maximalen Freisetzung. Die Inkubation von Ziel- und Effektorzellen erfolgte in U-Platten.

Weitere Optimierungsschritte ergaben in vier unabhängigen Experimenten, dass auch für die adhären ten Kopf-Hals-Tumor-Zell-Linien eine Inkubation von Effektor- und Zielzellen in V-Bodenplatten optimal ist, da hier die gemessene Δ Fluoreszenz der Spontan- und

maximalen Freisetzung deutlich höher ist als in den getesteten Flachbodenplatten (Abb. 3.7 und Tab. 3.3). Interessanterweise erwies sich eine kürzere Inkubationszeit von 2 h günstiger als eine Inkubationszeit von 3 h (Abb. 3.6, Tab. 3.2) und 4 h (Abb. 3.7, Tab. 3.3).

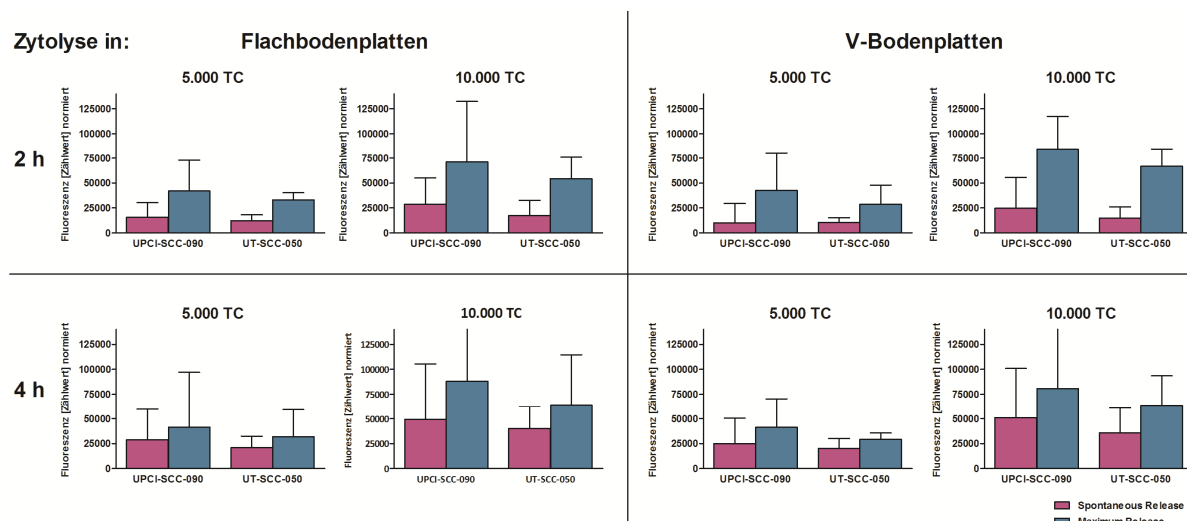


Abb. 3.7 Optimierung des DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstests für adhärente Zell-Linien, die aus Kopf-Hals-Tumoren etabliert wurden. In vier unabhängigen Experimenten wurden parallel verschiedene Platten und Inkubationszeiten für verschiedene Zellzahlen getestet. Dargestellt sind die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*). Die Inkubation in V-Bodenplatten ergab in fünf von acht Ansätzen eine höhere Δ Fluoreszenz (Differenz zwischen Spontan- und maximaler Freisetzung) als die Inkubation in Flachbodenplatten (siehe Tab. 3.3). Interessanterweise ergab die kürzere Inkubationszeit von 2 h besonders bei 10.000 Zielzellen (TC, *target cells*) eine höhere Δ Fluoreszenz als eine Inkubation von 3 h (Tab. 3.2) und 4 h (Tab. 3.3). Somit wurden folgende Kriterien für die weiteren Experimente mit den Zell-Linien UPCI-SCC-090 und UT-SCC-050 als optimal erachtet: Inkubation in V-Bodenplatten für 2 h mit 10.000 Zielzellen.

Tab. 3.3 Fluoreszenzwerte der Optimierung des DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstests für adhärente Zell-Linien, die aus Kopf-Hals-Tumoren etabliert wurden

Inkubationszeit	2 h		4 h	
Plattentyp	Flachboden	V-Boden	Flachboden	V-Boden
ΔFluoreszenz	UPCI-SCC-090			
5.000 Zielzellen	25.940	32.084	12.695	16.427
10.000 Zielzellen	42.469	59.148	39.078	29.861
ΔFluoreszenz	UT-SCC-050			
5.000 Zielzellen	20.513	17.957	11.149	9.007
10.000 Zielzellen	36.974	51.948	23.908	27.772

Δ Fluoreszenz der in Abb. 3.7 gezeigten Graphen. Δ Fluoreszenz berechnete sich aus der Differenz der Spontan- und maximalen Freisetzung. Die höchsten Δ Fluoreszenz-Werte sind fett hinterlegt und zeigen die optimalen Inkubationsbedingungen für beide Zell-Linien an: 2 h in V-Bodenplatten mit 10.000 Zellen.

Um zu ermitteln, ob sich der DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstests in der kurzen Inkubationszeit von 2 h auch als Assay zur Messung von T-Zellvermittelter Toxizität eignete, wurde in einem Experiment T-Zellen von einem HLA-A*02 homozygot positiven und einem

HLA-A*02 negativem Spender unspezifisch mittels Inkubation mit 500 IU/mL Proleukin® stimuliert. Hierfür wurden nach Isolation der MNZ die T-Zellen mittels MACS in einer Negativselektion angereichert (Pan T Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec) und 4 d mit 500 IU/mL Proleukin® inkubiert. Als Feeder Zellen wurde die jeweilige Positivfraktion getrennt von der Negativfraktion isoliert, mit 30 Gy bestrahlt und wieder zu den T-Zellen gegeben. Anschließend wurde ein DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest mit den optimierten Bedingungen durchgeführt. Auf Grund der niedrigen Zahl an T-Zellen, die nach der 4 d Inkubation mit Proleukin® für den Zytotoxizitätstest zur Verfügung standen, wurde als Zielzell-Linie nur eine der beiden Zell-Linien aus Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt, und zwar die HPV 16 positive UPCI-SCC-090. Es ist zu sehen, dass trotz der kurzen Inkubationszeit von 2 h eine deutliche zellvermittelte Toxizität in Abhängigkeit des HLA-A-Merkmals stattfand (Abb. 3.8). Während bei Inkubation von UPCI-SCC-090 mit dem HLA-A*02 negativen Spender keine spezifische Freisetzung von TDA messbar war, stieg bei Inkubation von UPCI-SCC-090 mit dem HLA-A*02 positiven Spender die spezifische Freisetzung von TDA mit steigender Effektorzellzahl deutlich an und lag bei einem Verhältnis EC:TC bei über 80 %. Das bedeutet, dass bei geeignet stimulierten HPV 16-spezifischen T-Zellen innerhalb von 2 h eine deutliche T-Zellvermittelte Toxizität auf der HPV 16-positiven Zell-Linie zu sehen sein müsste. Das Ergebnis der Reaktion auf die HPV 16-negative Zell-Linie müsste entsprechend ähnlich der Reaktion mit HLA-A*02 negativen Zellen verlaufen. Um dies zu testen, müsste eine entsprechend große Zahl an HPV 16-spezifischen T-Zellen expandiert werden, was das Ziel dieser Arbeit war. Die Expansion ist näher in Kapitel 3.3 beschrieben.

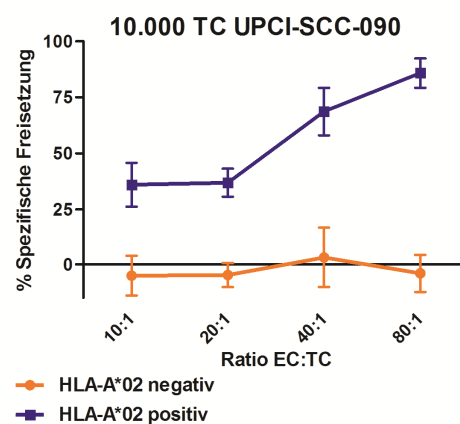


Abb. 3.8 DELFIA® EuTDA Zytotoxizitätstest als T-Zell-Assay. Proleukin® stimulierte T-Zellen waren in der Lage, HLA-abhängig die Zielzell-Linie UPCI-SCC-090 zu lysieren. Eine messbare - und mit zunehmendem Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle steigende - prozentuale spezifische Freisetzung konnte nur bei der Inkubation von UPCI-SCC-090 mit HLA-A*02 positiven T-Zellen (blau) detektiert werden, nicht bei der Inkubation von UPCI-SCC-090 mit HLA-A*02 negativen T-Zellen (orange). Die kurze Inkubationszeit von nur 2 h eignete sich auch zur Messung von T-Zellvermittelter Toxizität, setzte aber eine deutliche Stimulation der Zellen voraus. Dargestellt sind Medianwerte mit IQR (*Interquartile Ranges*), TC (*target cells*): Zielzellen, EC (*effector cells*): stimulierte T-Zellen.

3.2. Untersuchung von Zellen gesunder Probanden auf HPV-Spezifität

Die Berichte über spezifische zelluläre Reaktionen gegen HPV 16 bei gesunden Probanden sind stark von den getesteten Epitopen abhängig. Sie reichen von hohen Frequenzen E2-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen in bis zu 50 % der getesteten Probanden (de Jong, et al., 2002) bis zu einem völligen Fehlen von E6/E7-reaktiven T-Zellen (Ramos, et al., 2013). Eine Studie zu dem in Kapitel 1.4 beschriebenen Impfstoff, der ein L2E6E7 Fusionsprotein enthält, berichtet allerdings von einer Impfstoff-abhängigen Induktion der HPV 16 E6 und E7-spezifischen T-Zell Immunität in einem Großteil der geimpften Probanden (de Jong, et al., 2002). Daher stellte sich die Frage, wie es sich mit der HPV 16-spezifischen T-Zell Immunität bei Probanden verhält, die mit einem der bereits erhältlichen HPV-Impfstoffe geimpft wurden. So wurde im Rahmen der Studie "Immunität gegenüber humanem Papillomavirus (HPV) bei geimpften und ungeimpften Probanden" die Immunität in entsprechend geimpften und ungeimpften Freiwilligen gegen die Onkogene HPV 16 E6 und E7 mittels optimierten ELISpot-Analysen untersucht. Da in Deutschland die Impfung gegen HPV nur für weibliche Personen empfohlen ist (Ständige Impfkommission am RKI, 2012), ergaben sich folgende Probandengruppen: ungeimpft, männlich; ungeimpft, weiblich; geimpft, weiblich. Zunächst wurde die Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit HPV 16 E6 oder E7 Peptidmischen mittels optimiertem ELISpot-Verfahren untersucht (N = 18, 29 und 26). Hier zeigte sich, dass die medianen normierten Werte insgesamt sehr niedrig waren, obwohl die Streuung der Zahlen an IFN- γ sekretierenden Zellen für die Gruppe der geimpften Probandinnen deutlich größer war als für die anderen beiden Gruppen (Abb. 3.9 A). Normiert wurden die Werte gegen die Negativkontrolle, die Zahl an Zellen, die IFN- γ ohne Peptidstimulus sezernierten. Die einzigen signifikant verschiedenen Werte finden sich zwischen den ungeimpften und geimpften Probandinnen nach Stimulation mit HPV 16 E7 ($P = 0,04$, Mann-Whitney-Test). Eine Korrelationsanalyse in ungeimpften Probanden beiderlei Geschlecht ergab keine Korrelation zwischen Alter und IFN- γ sekretierenden Zellen, weder für HPV 16 E6 noch E7 (Abb. 3.9 B - E).

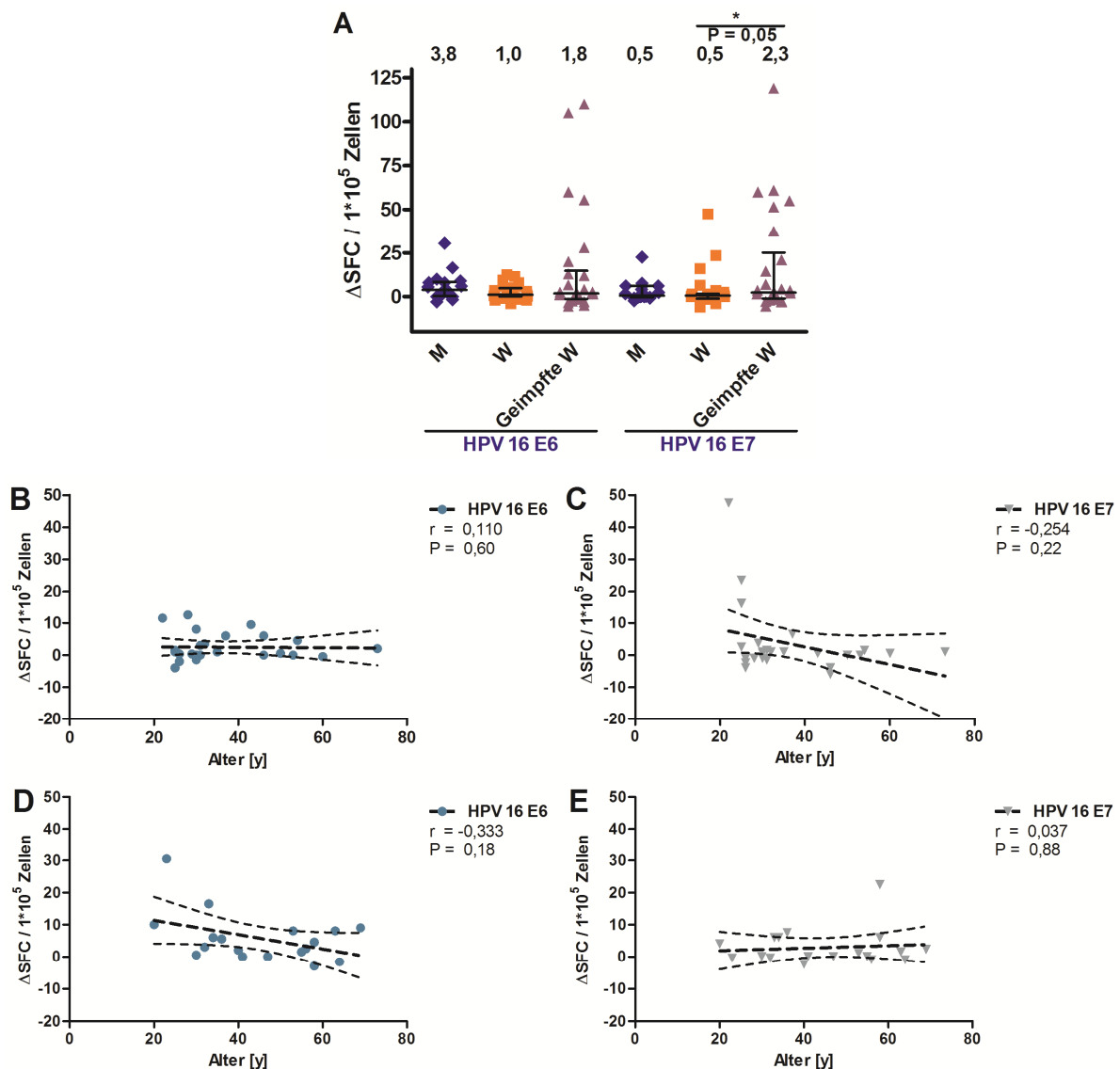


Abb. 3.9 Analyse der IFN- γ Sekretion mononukleärer Zellen von gesunden geimpften oder ungeimpften Probanden nach Stimulation mit HPV 16 E6 und E7. A) Die mediane normierte Zahl an IFN- γ sezernierenden Zellen (ΔSFC , Differenz der *Spot Forming Cells*) war insgesamt sehr niedrig ($N = 18, 29$ und 26). Normiert wurde gegen die Negativkontrolle, Zellen die IFN- γ ohne Peptidstimulus sezernierten. Die Streuung der Zahlen an IFN- γ sezernierenden Zellen war in der Gruppe der geimpften Probandinnen deutlich höher als in den beiden anderen Gruppen. Einzig zwischen den Gruppen ungeimpfte und geimpfte Probandinnen fanden sich nach Stimulation mit HPV 16 E7 signifikant verschiedene Werte ($P = 0,04$, Mann-Whitney-Test). **B - E)** Korrelationsanalysen nach Spearman (Konstante r) ergaben bei ungeimpften Probanden keine Korrelation zwischen Alter und IFN- γ Sekretion, weder nach Stimulation mit HPV 16 E6 (**B, D**) noch E7 (**C, E**) in weiblichen (**B, C**) und männlichen Probanden (**D, E**).

Parallel zum ELISpot wurde die Verteilung der Zellpopulationen im Vollblut HPV-geimpfter und nicht HPV-geimpfter Probandinnen durchflusszytometrisch bestimmt. Folgende Populationen wurden mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper bestimmt: Populationen an Leukozyten: Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten; Populationen der Lymphozyten: B-Zellen (CD19+), NK-Zellen (CD16+CD56+CD3-), T-Zellen (CD3+); Subpopulationen der CD3+ Zellen: CD4+ und CD8+ T-Zellen. Ferner wurde das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen berechnet. Die Zellzahl, sowie Verteilung der Populationen bewegte sich bei ungeimpften und geimpften Probandinnen weitestgehend im Bereich der diagnostischen

Normalverteilung (Abb. 3.10) und unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Die Einzelergebnisse sind im Anhang, Tab. 6.5 (S. 95) zu finden.

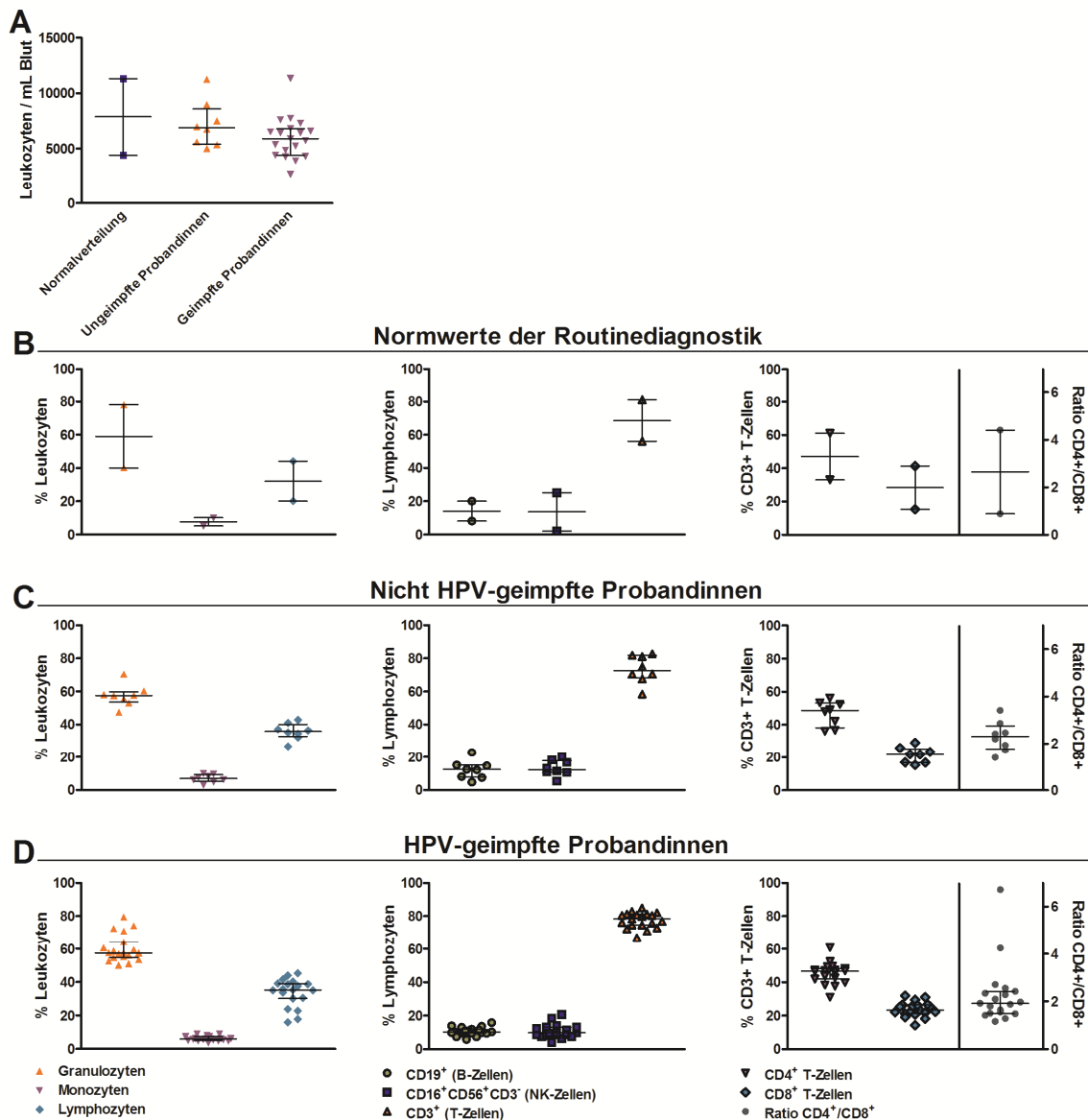


Abb. 3.10 Verteilung der Zellpopulationen gesunder geimpfter oder ungeimpfter Probandinnen. Neben der Zellzahl Leukozyten pro mL Blut (**A**) wurden folgende Zellpopulationen bestimmt: Populationen der Leukozyten: Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten; B-Zellen (CD19⁺), NK-Zellen (CD16⁺CD56⁺CD3⁻) und T-Zellen (CD3⁺) als Populationen der Lymphozyten und die Subpopulationen der CD3⁺ Zellen: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Ferner wurde das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen bestimmt (Ratio CD4⁺/CD8⁺). Die Zahlen der ungeimpften (**C**) und geimpften (**D**) Probandinnen bewegten sich weitestgehend im Bereich der diagnostischen Normwerte (**B**). Dargestellt sind in die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*) (**C** und **D**), sowie der Median und die Spannweite der Normwerte mit den jeweiligen Minimal- und Maximalwerten (**B**).

Ein Vergleich der Sekretion von IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin bei optimierten ELISpot-Assays zeigte, dass sich die Sekretionsprofile der Probandengruppen relativ ähnlich waren (Tab. 3.4, S. 49) (N = 5 (M), 13 (W, ungeimpft) und 26 (W, geimpft)) und sich die Werte lediglich bei der Messung von Perforin (Abb. 3.11 D) nach Stimulation mit HPV 16 E6 signifikant für ungeimpfte Probanden von ungeimpften Probandinnen (P = 0,02), bzw. geimpften Probandinnen (P = 0,01) unterschieden (Mann-Whitney-Test). Für IFN- γ (Abb. 3.11

A), Granzym B (Abb. 3.11 C) und Perforin (Abb. 3.11 D) waren bei der geimpften Probandengruppe die medianen Werte höher, für IL-10 (Abb. 3.11 B) deutlich niedriger als bei den ungeimpften Gruppen, vor allem nach Stimulation mit HPV 16 E7. Besonders bei IFN- γ und Perforin war außerdem die Streuung der Werte deutlich größer, was für eine insgesamt sehr individuelle Reaktion auf die Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 sprach. Für einen besseren Vergleich der einzelnen Zytokine / zytotoxischen Proteine wurden alle ELISpot-Ergebnisse auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet.

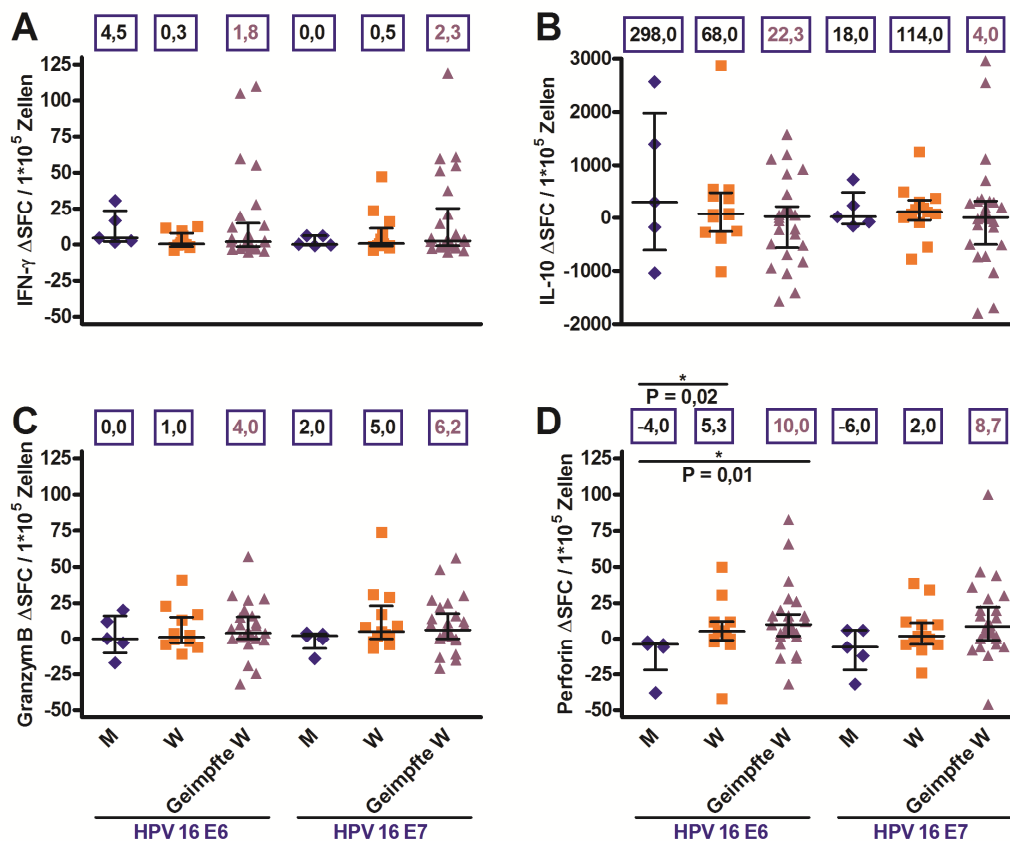


Abb. 3.11 Sekretionsprofil von Zellen ungeimpfter männlicher, ungeimpfter weiblicher und geimpfter weiblicher Probanden nach Stimulation mit HPV 16 E6 oder E7 in optimierten ELISpot-Assays. Für einen besseren Vergleich wurden die normierten Zahlen sezernierender Zellen (ΔSFC , Differenz der *Spot Forming Cells*) auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet. Dargestellt wurden die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*). Die gerahmten Zahlen geben die jeweiligen Mediane der entsprechenden Probandengruppe an. In parallelen ELISpot-Ansätzen wurde die Sekretion von IFN- γ (A), IL-10 (B), Granzym B (C), und Perforin (D) gemessen. Für IFN- γ , Granzym B und Perforin waren die medianen Werte in dem meisten Fällen höher in der Gruppe der geimpften Probandinnen im Vergleich zu den ungeimpften Gruppen, IL-10 war deutlich niedriger. Am deutlichsten war dies nach Stimulation mit HPV 16 E7 sichtbar. Jedoch war allein die Sekretion von Perforin nach Stimulation mit HPV 16 E6 signifikant verschieden zwischen ungeimpften Probanden und ungeimpften Probandinnen ($P = 0,02$), bzw. geimpften Probandinnen ($P = 0,01$, Mann-Whitney-Test). Die Streuung der Werte für IFN- γ und Perforin war in der Gruppe der geimpften Probandinnen deutlich größer als in den anderen beiden Gruppen.

Tab. 3.4 Sekretion von IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin nach Stimulation mit HPV 16 E6 oder E7 in optimierten ELISpot-Assays bei den verschiedenen Probandengruppen: männlich (M), ungeimpft; weiblich (W), ungeimpft und weiblich (W), geimpft

Gemessenes Protein	Stimulus HPV 16	Probandengruppe	Median	Minimalwert	Maximalwert
IFN- γ	E6	M, ungeimpft	4,5	1,5	30,5
		W, ungeimpft	0,3	-4,0	12,5
		W, geimpft	1,8	-5,5	110,0
	E7	M, ungeimpft	0,0	-1,0	6,0
		W, ungeimpft	0,5	-4,0	47,5
		W, geimpft	2,3	-5,5	119,0
IL-10	E6	M, ungeimpft	298	-1.042	2.564
		W, ungeimpft	68	-1.016	2.872
		W, geimpft	22	-1.568	1.576
	E7	M, ungeimpft	18	-156	728
		W, ungeimpft	114	-782	1.252
		W, geimpft	4	-1.694	2.958
Granzym B	E6	M, ungeimpft	0,0	-17,0	20,0
		W, ungeimpft	1,0	-11,0	41,0
		W, geimpft	4,0	-32,0	57,0
	E7	M, ungeimpft	2,0	-14,0	4,0
		W, ungeimpft	5,0	-6,7	74,0
		W, geimpft	5,3	-21,0	48,0
Perforin	E6	M, ungeimpft	-4,0	-38,0	-2,0
		W, ungeimpft	5,3	-42,0	50,0
		W, geimpft	10,0	-32,0	66,0
	E7	M, ungeimpft	-6,0	-32,0	6,0
		W, ungeimpft	2,0	-24,0	38,7
		W, geimpft	8,7	-46,0	100,0

Für einen besseren Vergleich wurde auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet. Dargestellt sind die medianen, minimalen und maximalen Werte. Die breite Streuung der gemessenen Werte wies auf eine sehr individuelle Reaktion auf die Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 hin.

3.3. Expansion HPV 16-spezifischer MNZ

3.3.1. HPV 16-spezifische Expansion vs. CMV-spezifische Expansion

Die insgesamt sehr niedrigen Reaktionen auf die Stimulation von Lymphozyten gesunder Spender mit HPV 16 E6 und E7 zeigte, dass eine massive Expansion HPV 16-spezifischer Zellen für eine mögliche Immuntherapie unumgänglich ist. Gleichzeitig stellte sie uns vor das Problem, dass auf Grund der niedrigen Reaktionen die Entwicklung optimaler Expansionsbedingungen nur schwer realisierbar war. Daher wurde ein Virus-spezifisches Expansionsmodell ausgewählt, bei dem wir eine höhere Frequenz Virus-spezifischer Zellen erwarteten. Die Wahl fiel aus zwei Gründen auf CMV-spezifische Lymphozyten: Zum einen gab es hier die Möglichkeit, die Lymphozyten positiv getesteter Personen zu verwenden. Die

Durchseuchung mit CMV liegt in Deutschland bei etwa 50 % (Miksits & Hahn, 2003), was bedeutet, dass ausreichend viele Probanden zur Verfügung stehen. Zum anderen sind für die Expansion CMV-spezifischer Zellen bereits Protokolle veröffentlicht (Chiu, Schneck, & Oelke, 2011; van Leeuwen, Gamadia, Baars, Remmerswaal, ten Berge, & van Lier, 2002; Sun, et al., 1999; Trivedi, Williams, O'Reilly, & Koehne, 2005; Vannucchi, Glinz, Bosi, Caporale, & Rossi-Ferrini, 2001). Die Vielfältigkeit der Expansionsprotokolle ließ darauf schließen, dass sich ein GMP-konformes Protokoll zur Expansion CMV-spezifischer Lymphozyten gut etablieren ließe. So wurde zunächst ein Protokoll für CMV-spezifische Expansion adaptiert (basierend auf Wöfl, et al., 2011) mit den Zytokinen IL-7, IL-15 und IL-21 in RPMI1640. Eine gemeinsame Gabe der Zytokine von Beginn an ergab gute Wachstumsergebnisse von einmalig Peptidmix-stimulierten CMVpp65-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Anreicherung aktivierter CD137⁺ Zellen. Testungen der Kooperationspartner bei Miltenyi Biotec und der HNO-Klinik ergaben jedoch, dass sich Protokolle für die CMV-spezifische Expansion nicht ohne weiteres auf die HPV 16-spezifische Expansion übertragen ließen. Da die gewählte Kombination an Zytokinen nicht zu einem ausreichenden Wachstum der CD8⁺CD137⁺ HPV 16-spezifischer Lymphozyten führte, wurde das Protokoll von den Kooperationspartnern der HNO-Klinik um das Zytokin Proleukin[®] erweitert. Proleukin ist ein artifiziell hergestelltes Protein, das IL-2 sehr ähnlich ist und - ebenso, wie IL-2 - die Expansion von Lymphozyten anregt (Novartis Pharma GmbH, 2014), wodurch die Proliferation CD8⁺CD137⁺ HPV 16-spezifischer T-Zellen verbessert werden sollte. Ein Vergleich der Sekretionsprofile (IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin) für CMVpp65-spezifische T-Zellen mit HPV 16 E6 und E7-spezifischen T-Zellen in optimierten ELISpot-Assays sollte zeigen, ob sich eine CMV-spezifische Expansion als Modell für die Optimierung von HPV 16-spezifischen Zellen eignet. Für diesen Vergleich wurden parallel von gesunden, CMV-positiven Spendern kryokonservierte Lymphozyten (N = 3) nach einer 24-stündigen Ruhephase zunächst parallel T-Zellen (Pan T Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec) oder CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺ T Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec) mittels Negativisolation angereichert und anschließend mit CMVpp65- oder HPV 16 E6 und E7 (1:1)-Peptidmischen ON stimuliert. Anschließend wurden im nächsten Schritt aktivierte T-Zellen über Positivisolation von CD137⁺ Zellen angereichert. Den CD137⁺ T-Zellen wurden Zellen der Negativfraktion im Verhältnis 1:10 als Feeder Zellen zugesetzt und in Expansionsmedium (RPMI1640, HS, Proleukin[®], IL-7, IL-15 und IL-21) kultiviert. Nach sieben Tagen Expansion erfolgte eine 24-stündige Ruhephase, bevor die expandierten Zellen einer Funktions- und Spezifitätstestung mittels ELISpot-Analysen unterzogen wurden, bzw. eine Restimulation mit den entsprechenden Peptidmischen und eine weitere Runde Expansion durchgeführt wurde. Nach weiteren sieben Tagen Expansion und Ruhephase wurden auch diese Zellen einer Funktions- und Spezifitätstestung unterzogen. In Ansätzen mit expandierten Zellen dienten nicht restimierte Zellen als "Negativkontrolle", bzw.

Referenzwert, und restimierte Zellen der spezifischen Messung. Die Ergebnisse der Zellen nach ein und zwei Runden Expansion wurde mit den initialen Ergebnissen unstimulierter Zellen verglichen (Abb. 3.12). Es zeigte sich erfreulicherweise, dass in keinem der Ansätze die Sekretion an IL-10 über die Expansionszeit zunahm. Die Reaktionen blieben nach ein und zwei Runden Expansion deutlich unter den initialen Werten (Abb. 3.12 B und F). In den restlichen Messungen zeichnete sich kein deutliches Bild ab. Bei der CMVpp65-spezifischen Expansion sezernierte eine nicht mehr messbare Zahl T-Zellen nach einer Runde Expansion sehr viel IFN- γ (Abb. 3.12 A) und Granzym B (Abb. 3.12 C), während die Zahl an restimulierten Zellen, die Perforin sezernierten, deutlich unter der Zahl an nicht restimulierten Zellen zurückblieb (Abb. 3.12 D). Bei der CMVpp65-spezifischen Expansion CD8⁺ T-Zellen blieb die Menge an Zellen, die IFN- γ sezernierten, nach einer Runde Expansion deutlich unter dem initialen Wert und stieg erst nach der zweiten Expansionsrunde auf den ursprüngliche Menge Zellen an, wobei die Differenz zwischen restimulierten und nicht restimulierten Zellen deutlich kleiner war, als die Differenz zwischen initial stimulierten Zellen und der tatsächlichen Negativkontrolle. Die Tendenz, dass nach einer Runde Expansion weniger CD8⁺ T-Zellen Zytokine, bzw. zytotoxische Proteine sezernierten und die Zahl erst nach einer zweiten Expansionsrunde deutlich stieg, fand sich auch in der Messung von Granzym B wieder. Lediglich bei der Messung von Perforin stieg die Zahl an sezernierenden Zellen bereits nach einer Expansionsrunde deutlich an und fiel nach der zweiten Runde Expansion unter die initialen Werte. Insgesamt erweckten die Ergebnisse der ELISpots CMVpp65-spezifisch expandierter Zellen den Eindruck, dass die Zellen bereits nach einer Runde Expansion erschöpft waren, da die Funktionsfähigkeit, Zytokine und zytotoxische Proteine zu sezernieren, nach der zweiten Expansionsrunde teilweise deutlich nachließ. Das Bild der HPV 16-spezifischen Expansion war ebenso wenig eindeutig, wie das der CMVpp65-spezifischen Expansion. Während die Zahl der Zellen, die IFN- γ sezernierten, für T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen insgesamt über die Expansionsdauer anstieg, bewegten sich die Differenzen zwischen (re)stimulierten und nicht (re)stimulierten Zellen in einem ähnlichen Rahmen oder wurde sogar kleiner (Abb. 3.12 E). Sowohl bei der Expansion von T-Zellen als auch der Expansion von CD8⁺ T-Zellen sezernierten nach einer Runden Expansion weniger restimierte Zellen Granzym B, als nicht restimierte Zellen (Abb. 3.12 G). Bei den CD8⁺ T-Zellen setzte sich dieses Bild auch nach der zweiten Expansionsrunde fort, während eine kleine Menge mehr restimierte T-Zellen als nicht restimierte T-Zellen Granzym B sezernierten. Bei der Messung von Perforin (Abb. 3.12 H) ergab sich ein ähnlich unstimiges Bild, es sezernierten mehr HPV 16-spezifisch expandierte T-Zellen Perforin vor als nach Restimulation. Insgesamt mehr expandierte CD8⁺ T-Zellen sezernierten vor und nach Restimulation Perforin, jedoch vergrößerte sich auch hier die Differenz nicht und die Menge nahm von Expansionsrunde eins nach Expansionsrunde zwei wieder ab, auch wenn sie insgesamt über den initialen Werten blieb.

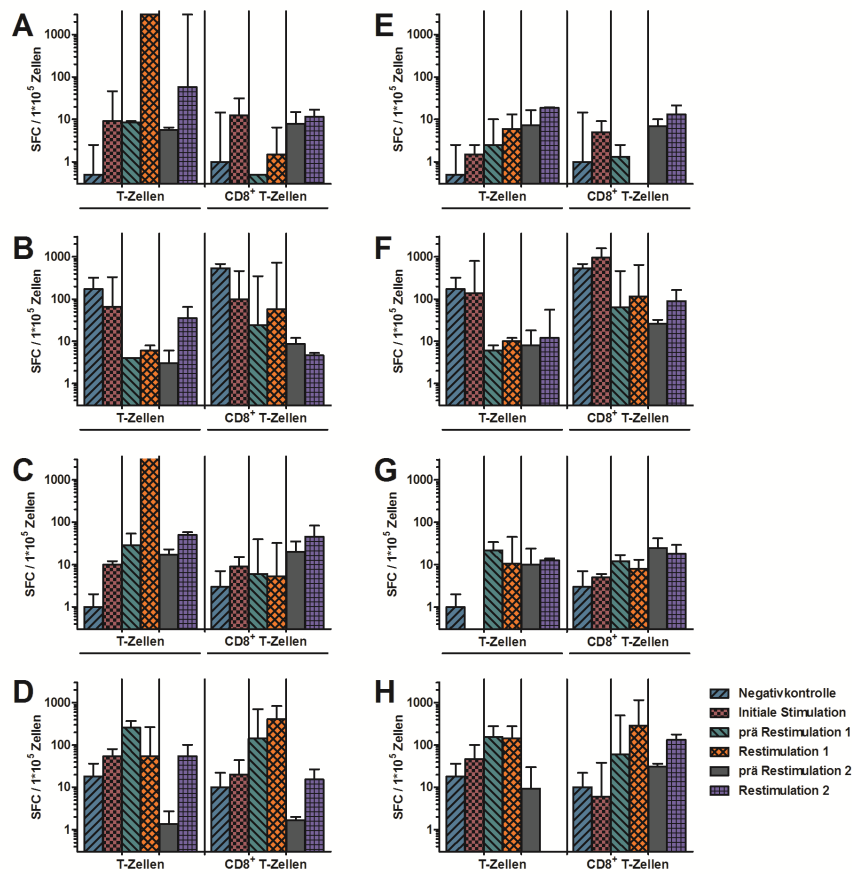


Abb. 3.12 Sekretionsprofil CMVpp65-spezifisch expandierter Zellen vs. HPV 16-spezifisch expandierter Zellen. Parallel wurden IFN- γ (A, E), IL-10 (B, F), Granzym B (C, G) und Perforin (D, H) von Zellen nach ein und zwei Runden CMVpp65-spezifischer (A - D) oder HPV 16 E6 und E7 (1:1)-spezifischer Expansion (E - H) in optimierten ELISpot-Assays gemessen und mit initial stimulierten Zellen verglichen (N = 3). Für einen besseren Vergleich zwischen den Zytokinen / zytotoxischen Proteinen wurde auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet [*Spot Forming Cells* (SFC) / $1 \cdot 10^5$ Zellen]. Dargestellt wurden die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*) (sofern messbar). In der initialen Stimulation fand sich die einzig tatsächliche Negativkontrolle, in den Ansätzen mit expandierten Zellen dienten nicht restimierte Zellen als Referenz für spezifisch restimierte Zellen. In allen Ansätzen blieb die Zahl an Zellen, die IL-10 sezernierten, nach ein und zwei Runden Expansion deutlich unter den initialen Werten. Die restlichen Reaktionen ergaben kein eindeutiges Bild. Problematisch war zum einen, dass bei CMVpp65-spezifischer Expansion die Reaktionen von Expansionsrunde eins nach zwei deutlich abnahmen, was auf eine Erschöpfung der Zellen hinwies. Zum anderen zeigte sich keine deutlich zunehmende Differenz zwischen nicht restimulierten und restimulierten HPV 16-expandierten Zellen. Teilweise lagen die Zahlen an sezernierenden restimulierten Zellen sogar unter denen der sezernierenden nicht restimulierten Zellen.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass eine CMVpp65-spezifische Expansion sich nicht als Modell für die Entwicklung eines HPV 16-spezifischen Expansionsprotokolls eignete, da die Reaktionen der Zellen auf CMVpp65 und HPV 16 zu unterschiedlich waren. Deshalb konzentrierte ich mich in meiner weiteren Arbeit auf die direkte Entwicklung eines Protokolls zur Expansion HPV 16-spezifischer Zellen.

3.3.2. HPV-spezifische Expansion mittels reiner Peptidmix-Stimulation

Die oben beschriebene geringe Zunahme an HPV 16-spezifischen Zellen könnte an der Art der initialen Stimulation liegen. Aus diesem Grund wurden für alle folgenden Experimente kryokonservierte Lymphozyten gesunder Spender nach einer 24-stündigen Ruhephase

zuerst über Nacht mit HPV 16 E6 und E7 (1:1)-Peptidmischen stimuliert, bevor dann T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen mittels Negativisolation und direkt anschließend aktivierte T-Zellen über Positivisolation von CD137⁺ Zellen angereichert wurden. Daneben wurde das Basismedium RPMI1640 mit 10% HS für die Expansion durch ein spezifisches, für die Kultivierung und Expansion humaner T-Zellen entwickeltes Medium, TexMACSTM (Miltenyi Biotec), ersetzt. Außer der Änderung des Expansionsmediums in TexMACSTM plus IL-7, IL-15, IL-21 und Proleukin[®] wurden keine weiteren Änderungen des prinzipiellen Expansionsprotokolls vorgenommen. Die Restimulationen der Zellen erfolgte an Tag 8 und 17, die Versuche (N = 3) wurden an Tag 24 (= prä Restimulation 3) beendet, da nach der ersten Restimulation keine Expansion sichtbar war und die Zellzahl beständig abnahm, was sich sowohl in den gemessenen Zellzahlen als auch in Bildern der Kulturen widerspiegelte (Abb. 3.13). Rein optisch erweckten die Kulturen zu Beginn den Eindruck, dass eine Expansion CD8⁺ T-Zellen günstiger war als die Expansion von T-Zellen, da hier mikroskopisch mehr Kolonien auszumachen waren (Abb. 3.13 B). Da diese jedoch deutlich kleiner waren als die Kolonien der T-Zellen, ergab sich nach einer Runde Expansion für die CD8⁺ T-Zellen insgesamt eine niedrigere mediane Zellzahl (Abb. 3.13).

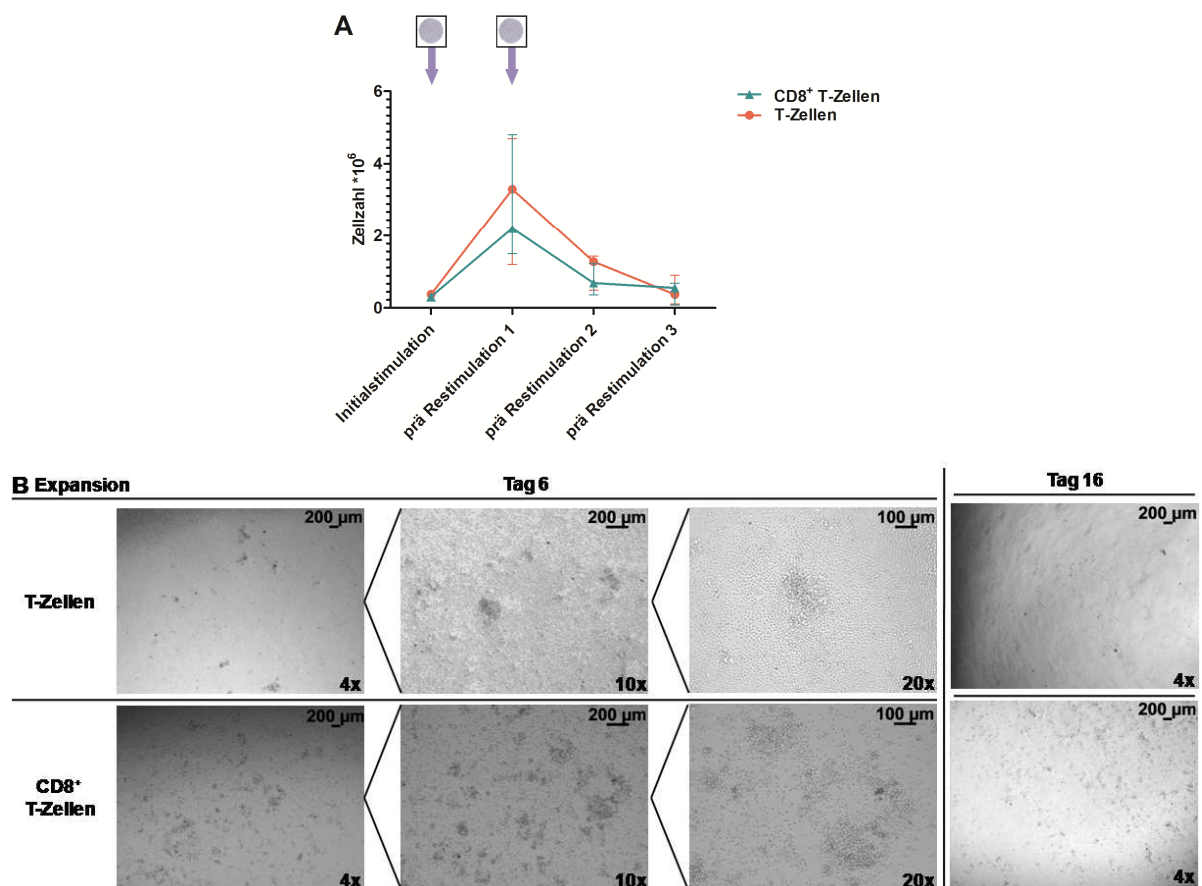


Abb. 3.13 HPV 16-spezifische Expansion von T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen mittels reiner Peptidmix-Stimulation. **A)** Darstellung der medianen Zellzahlen mit IQR (*Interquartile Ranges*) über den gesamten Expansionszeitraum hinweg. Gemessen wurden die Zellzahlen nach Anreicherung aktivierter CD137⁺ Zellen an Tag 0 (= Initialstimulation), bzw. vor den Ruhephasen der Restimulationen an Tag 7 (= prä Restimulation 1), Tag 16 (= prä Restimulation 2) und Tag 24 (= prä

Restimulation 3). Während die Zahlen in der ersten Expansionsrunde deutlich anstiegen, nahmen sie anschließend über den restlichen Expansionszeitraum hinweg beständig massiv ab. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte an, zu denen Funktions- und Spezifitätsmessungen mittels optimierten ELISpot-Assays durchgeführt wurden. **B)** Mikroskopische Aufnahmen der Kulturen an Tag 6 (erste drei Spalten), bzw. Tag 16 (Bilder rechts) nach Expansionsbeginn aufgenommen. Die verwendeten Vergrößerungen der einzelnen Aufnahmen sind in den Bildern angegeben.

Auf Grund der gemessenen Zellzahlen wurden nur zu zwei Zeitpunkten Funktions- und Spezifitätstestungen mittels optimierten ELISpot-Analysen durchgeführt, zum Zeitpunkt der initialen Stimulation und nach einer Runde Expansion (siehe eingezeichnete Pfeile in Abb. 3.13 A). Nach den weiteren Expansionsrunden lag nicht mehr genügend Zellmaterial für eine parallele Testung von IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin vor, sodass nicht zuletzt aus diesen Gründen auf weitere Testungen verzichtet wurde. Ein weiterer Grund waren die Ergebnisse der ELISpot-Assays expandierter Zellen nach der ersten Expansionsrunde (Abb. 3.14). Wie in der beispielhaften Abbildung von ELISpot Filteraufnahmen eines Expansionsversuchs (Abb. 3.14 A) deutlich wurde, stiegen bereits die Kontrollwerte der nicht restimulierten Zellen nach einer Runde Expansion relativ stark an, während die spezifischen Werte der restimulierten Zellen nur geringfügig höher als die Kontrollwerte lagen. Die Differenz zwischen unstimulierten, bzw. nicht restimulierten und (re)stimulierten Zellen nahm in diesen Versuchen weder bei der Expansion von T-Zellen noch bei der Expansion von CD8⁺ T-Zellen zu. Was bei der Messung von IL-10 (Abb. 3.14 C) erwünscht war, da hier deutlich wurde, dass die gewählte Expansionsstrategie nicht zu einer herunter regulierenden Immunantwort führte, legte bei der Messung von IFN- γ (Abb. 3.14 B), Granzym B (Abb. 3.14 D) und Perforin (Abb. 3.14 E) den Schluss nahe, dass neben der Stimulation durch HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen und der günstig auf die Homöostase und Proliferation von T-Zellen wirkende Zytokine weitere sog. *scaffold* Reagenzien für eine erfolgreiche HPV 16-spezifische Expansion notwendig waren.

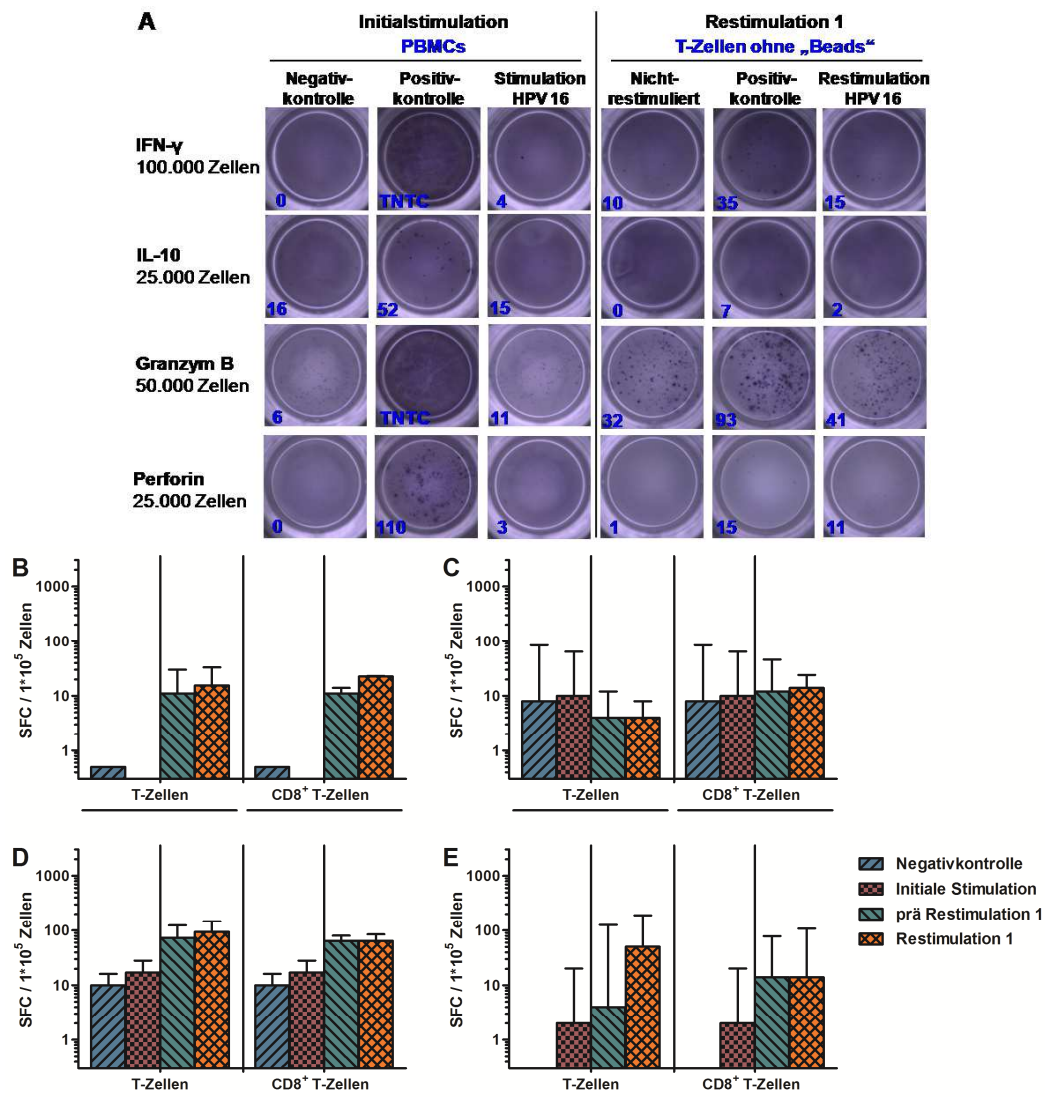


Abb. 3.14 Funktions- und Spezifitätsanalyse HPV 16-spezifisch expandierter T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen bei reiner Peptidmix-Stimulation. A) Aufnahmen von Filtern entwickelter ELISpot-Assays. Links die Sekretion von Lymphozyten eines Spenders bei der initialen Stimulation, rechts die Sekretion der Lymphozyten desselben Spenders nach einer Expansionsrunde. Deutlich zu erkennen war, dass bereits nach einer Expansionsrunde die Zahl der Zellen, die nicht restimuliert IFN-γ und Granzym B sezernierten, stieg, während die Zahl der Zellen, die bei spezifischer Restimulation diese Zytokine / zytotoxischen Proteine sezernierten, nur unwesentlich höher lag. Eine parallele Analyse von IFN-γ (B), IL-10 (C), Granzym B (D) und Perforin (E) in N = 3 unabhängigen Experimenten ließ erkennen, dass die gewählte Expansionsstrategie nicht zu einer herunter regulierenden Immunantwort führte, da die Menge an Zellen, die nach (Re)Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 IL-10 sezernierten nicht (T-Zellen) oder nur unwesentlich (CD8⁺ T-Zellen) anstieg. Jedoch zeigte sich auch, dass HPV 16-spezifische Zellen nicht expandiert wurden, die Differenz zwischen restimulierten und nicht-restimulierten Zellen stieg sowohl bei der Expansion von T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen größtenteils nicht an, sondern nahm ab. Für einen besseren Vergleich zwischen den Zytokinen / zytotoxischen Proteinen wurde auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet [SFC (*Spot Forming Cells*)/ 1*10⁵ Zellen]. Dargestellt wurden die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*).

3.3.3. HPV-spezifische Expansion: "Beads" als *scaffold* Reagenzien

Nachdem die alleinige Stimulation von Lymphozyten durch HPV 16 E6 und E7 Peptidmixe und dem Zytokincocktail aus Proleukin, IL-7, IL-15 und IL-21 nicht zu HPV 16-spezifischer Expansion von CD137⁺ T-Zellen oder CD8⁺CD137⁺ T-Zellen führte, wurde als nächstes der Einsatz von sog. artifiziellen APC getestet. Hierfür wurde dasselbe Protokoll mit

kryokonservierten Zellen derselben Spender aus den in 3.3.2 beschriebenen Experimenten verwendet, jedoch wurden während der Expansionsrunden zusätzlich zu den gewählten Zytokinen die artifiziiellen APC eingesetzt. Als artifiziielle APC wurden MACSiBead Particles verwendet, die nach Herstellerangaben mit CD3- (Klon OKT3) und CD28-Antikörpern (Klon 15E8) im Verhältnis 1:1 beschichtet wurden (siehe Kapitel 2.2.8). Zur besseren Lesbarkeit werden diese beschichteten Partikel als "Beads" bezeichnet werden. Der Einsatz der "Beads" erfolgte auf Basis des Protokolls zur Expansion aktivierter T-Zellen von Miltenyi Biotec (T Cell Activation/Expansion Kit, human) im Verhältnis "Beads" zu Zellen 1:2. Weitere Modifikationen wurden zunächst nicht vorgenommen, die Messungen der Zellzahlen (zu denselben Zeitpunkten, wie in 3.3.2 beschrieben) und mikroskopische Aufnahmen der angesetzten Kulturen zeigten jedoch ein deutliche Zunahme an Zellen, besonders bei der Expansion $CD8^+CD137^+$ T-Zellen (Abb. 3.15). Bereits an Tag 6 nach Expansionsbeginn waren deutlich mehr und größere wachsenden Klone zu sehen (Abb. 3.15 B). Nach der zweiten Restimulation nahm die Zellzahl allerdings nicht weiter zu. Dies lag vermutlich an der Abnutzung der zugesetzten "Beads" und zumindest wurde im generellen Protokoll zur Expansion aktivierter T-Zellen des T Cell Activation/Expansion Kit, human ein erneuter Zusatz der "Beads" für eine Expansion, die länger als 14 Tage dauert, empfohlen.

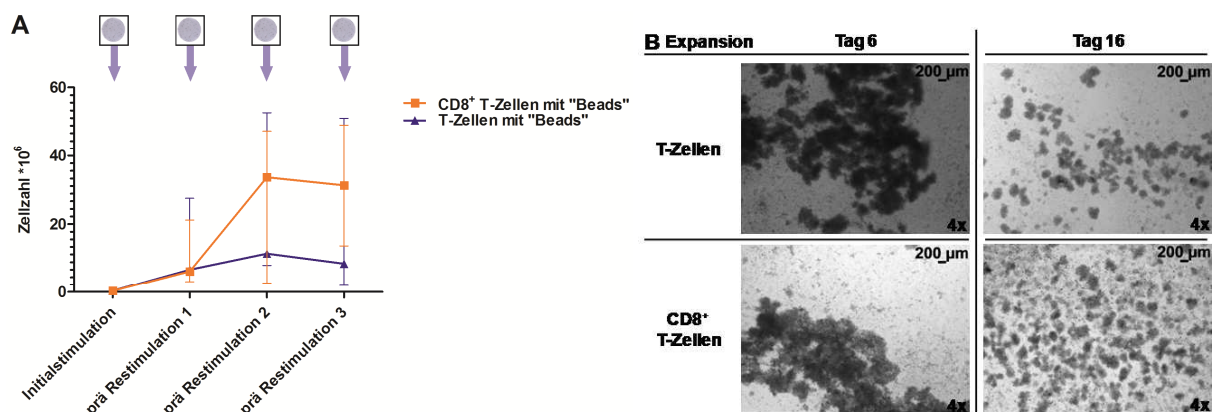


Abb. 3.15 HPV 16-spezifische Expansion von T-Zellen oder $CD8^+$ T-Zellen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" als *scaffold* Reagenzien. **A)** Darstellung der medianen Zellzahlen mit IQR (*Interquartile Ranges*) über den gesamten Expansionszeitraum hinweg. Die Messzeitpunkte entsprachen denselben, wie in Abb. 3.15 beschrieben. Über den gesamten Zeitraum hinweg war eine deutliche Zunahme der Zellzahlen messbar, besonders bei der Expansion von $CD8^+CD137^+$ T-Zellen. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte an, zu denen Funktions- und Spezifitätsmessungen mittels optimierten ELISpot-Assays durchgeführt wurden. **B)** Mikroskopische Aufnahmen der Kulturen in der 4x Vergrößerung. Die Bilder wurden ebenfalls an Tag 6 (Bilder links) und Tag 16 (Bilder rechts) nach Expansionsbeginn aufgenommen und spiegelten deutlich die gemessenen Zellzahlen optisch wider. Die zugesetzten "Beads" waren in dieser Vergrößerung auf Grund ihrer Größe von 3,5 μm nicht eindeutig identifizierbar.

Da in diesen Experimenten die Zellzahlen beständig zunahmen, bzw. zumindest bis zuletzt ausreichend hoch blieben, konnte zu allen Stimulationszeitpunkten Funktions- und Spezifitätstestungen mittels optimierter ELISpot-Analyse durchgeführt werden (siehe eingezeichnete Pfeile in Abb. 3.15 A). Bereits zur ersten Restimulation wurde sichtbar, dass deutlich mehr nicht-restimierte Zellen mit "Beads" IFN- γ , Granzym B und Perforin

sezernieren, als nicht-restimulierte Zellen ohne "Beads" (Vergleich Abbildung von ELISpot Filteraufnahmen der Restimulation 1, Abb. 3.16 A und Abb. 3.14 A). Somit war bereits zur ersten Restimulation keine HPV 16-spezifische Sekretion von IFN- γ , IL-10, Granzym B oder Perforin mittels ELISpot-Analysen messbar (Abb. 3.16 B - E). Während die Zahl an Zellen, die IL-10 sezernierten, über den gesamten Expansionszeitraum hinweg auf einem ähnlichen Niveau blieb (Abb. 3.16 C), nahm die Fähigkeit der Zellen, Granzym und Perforin nach Restimulation vermehrt zu sezernieren, nach der ersten Restimulation ab (Abb. 3.16 D, E), wenngleich die Werte insgesamt deutlich über dem initialen Niveau blieben. Die Zahl an Zellen, die IFN- γ sezernierten, stieg zur ersten Restimulation stark unspezifisch an und blieb von Restimulation 1 zu Restimulation 3 auf diesem Niveau (Abb. 3.16 B). Alles in allem war in diesen Ansätzen keine HPV 16-spezifische Sekretion von IFN- γ , IL-10, Granzym B oder Perforin messbar.

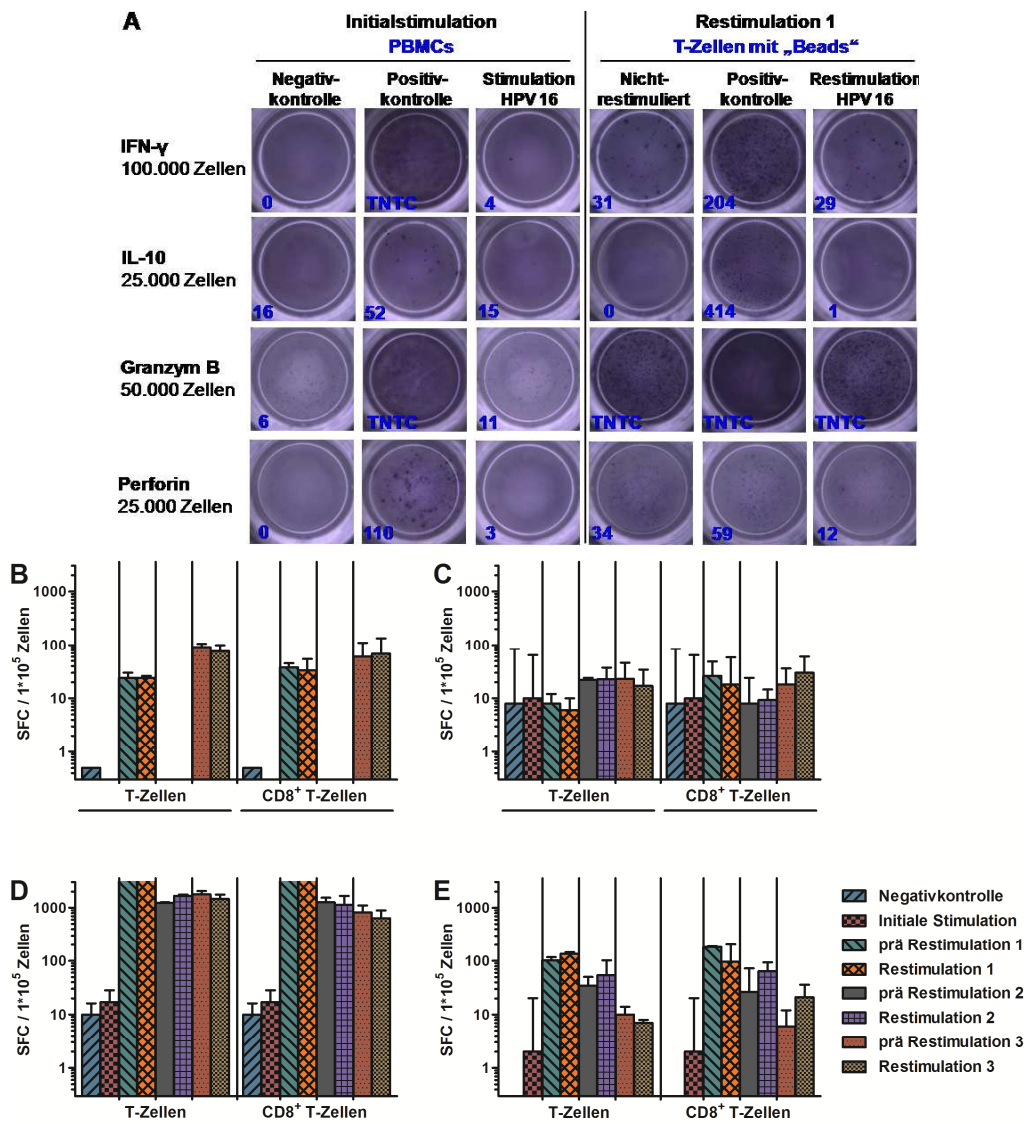


Abb. 3.16 Funktions- und Spezifitätsanalyse HPV 16-spezifisch expandierter T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" als scaffold Reagenzien. A) Aufnahmen von Filtern entwickelter ELISpot-Assays. Links die Sekretion von Lymphozyten eines Spenders bei der initialen Stimulation, rechts die Sekretion der Lymphozyten desselben Spenders nach einer

Expansionsrunde mit Zusatz von MACSiBead Particles beladen mit CD3- und CD28-Antikörpern ("Beads"). Deutlich zu erkennen war, dass nach der ersten Runde an Expansion die Zahl der Zellen, die nicht restimuliert IFN- γ , Granzym B und Perforin sezernierten, deutlich höher lag, als bei der Expansion ohne Zusatz von Beads (siehe Abb. 3.16 A). In diesem Beispiel ließ sich keine HPV 16-spezifische Reaktion nach Restimulation mit HPV 16 E6 und E7 nachweisen. Die parallele Analyse von IFN- γ (B), IL-10 (C), Granzym B (D) und Perforin (E) ließ keine HPV 16-spezifische Sekretion nach den Stimulationen erkennen, es stieg lediglich bereits zur ersten Restimulation die unspezifische Sekretion von IFN- γ Granzym B und Perforin bei nicht restimulierten Zellen sehr stark an. Des Weiteren nahm die Fähigkeit der mit "Beads" expandierten Zellen, Granzym B oder Perforin zu sezernieren, nach der ersten Restimulation ab, während die Sekretion von IL-10 über den gesamten Zeitraum hinweg auf einem ähnlichen Niveau blieb und die Sekretion von IFN- γ zur ersten Restimulation insgesamt stark anstieg und von der ersten zur dritten Restimulation hoch blieb. Für einen besseren Vergleich zwischen den Zytokinen / zytotoxischen Proteinen wurde auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet [SFC (*Spot Forming Cells*) / $1 \cdot 10^5$ Zellen]. Dargestellt wurden die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*).

Die durchweg hohen unspezifischen Reaktionen, die in den ELISpot-Assays gemessen wurden, konnten den Umständen geschuldet sein, dass sich die "Beads" während der Durchführung der Assays noch in den Kulturen befanden. Dies ist der Fall, da sich die "Beads" nur durch einen speziellen Magneten entfernen ließen und nicht etwa durch Zentrifugation. Auf Grund der Dauer der ELISpot-Assays von zweieinhalb Tagen (Vorinkubation plus zwei Tage Inkubation auf den Filterplatten) lag es im Bereich des Möglichen, dass die "Beads" in dieser Zeit die Sekretion der Zellen beeinflussten und so eine messbare spezifische Reaktion auf die Peptidmixe HPV 16 E6 und E7 blockierten. Hinweise hierauf fanden sich ebenfalls im Protokoll zur Expansion aktivierter T-Zellen des T Cell Activation/Expansion Kit, human (Miltenyi Biotec). So wurde hier ein Entfernen der "Beads" empfohlen, wenn T-Zellen zur Ruhe kommen sollten. Außerdem wurde beschrieben, dass das Entfernen der "Beads" möglicherweise für die Restimulation der expandierten Zellen mit verschiedenen Agenzien oder Antigenen erforderlich sei. Aus diesen Gründen wurden die Experimente nochmals mit kryokonservierten Lymphozyten derselben Spender aus den zuvor beschriebenen Expansionsansätzen durchgeführt. Das Protokoll wurde um das Entfernen der "Beads" zur jeweiligen 24-stündigen Ruhephase vor Restimulation ergänzt. Hierfür wurde der MACSiMAG Separator nach Herstellerangaben verwendet. Die magnetischen MACSiBead Particles verblieben dabei im magnetischen Feld des MACSiMAG Separators, während die Zellen mit der umgebenden Phosphat-gepufferten Salzlösung entnommen wurden. Das Entfernen der Beads wirkte sich allerdings dramatisch auf das Wachstum der Zellen, besonders der T-Zellen, aus. Die Zellzahlen brachen ein und nahmen über den Expansionszeitraum sehr stark ab (Abb. 3.17 A). Auf Grund der Zellzahlen konnten keine Funktions- und Spezifitätstestungen durchgeführt werden. Da besonders die T-Zellen betroffen waren, wurden die Experimente nochmals mit kryokonservierten Lymphozyten derselben Spender wie bisher angesetzt, jedoch nur eine Expansion mit CD8⁺CD137⁺ T-Zellen versucht. Außerdem wurden parallel verschiedene Bedingungen getestet, um zu sehen, ob und wenn ja welchen Einfluss eine andere Zytokinkonzentration an IL-15 und IL-21 und ein anderes Verhältnis an "Beads" zu Zellen auf das Zellwachstum

haben könnte. Die Auflistung der verschiedenen Bedingungen ist in Tab. 3.5 (S. 59) zu finden. Insgesamt war das Wachstum der CD8⁺CD137⁺ T-Zellen deutlich geringer, als in den bisherigen Versuchen, obwohl die "Beads" nicht entfernt wurden (vergleichen Sie hierfür die Abb. 3.17 B mit Abb. 3.16 A, Abb. 3.15 A und Abb. 3.13 A). Dennoch schien eine höhere Konzentration an IL-15 und IL-21 sich insgesamt besser auf das Wachstum auszuwirken (Bedingungen C - E), als die bisher verwendete niedrigere Konzentration (Bedingungen A und B). Gleichzeitig schien das Verhältnis von "Beads" zu Zellen von 1:2 günstiger zu sein, als ein Verhältnis von 1:5 oder kein Zusatz von "Beads" trotz höherer Konzentration der genannten Zytokine (vergleichen Sie hierfür Bedingungen B mit A, bzw. D mit E und C). IL-15 wurde mit einer höheren Konzentration getestet, da es die Proliferation aktivierter T-Zellen und die Generierung zytotoxischer T-Zellen stimuliert und für den Erhalt von CD8⁺ Gedächtniszellen wichtig ist (Miltenyi Biotec, 2012). Auch IL-21 stimuliert die Proliferation von Lymphozyten und fördert die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen (Miltenyi Biotec, 2012). Insgesamt schienen die Bedingungen D mit der höheren Konzentration an IL-15 und -21 und einem Verhältnis von "Beads" zu Zellen von 1:2 die günstigste der getesteten Bedingungen zu sein. Das schlechte Wachstum der Zellen könnte auf die lange Lagerung der isolierten Lymphozyten zurückzuführen sein, obwohl die Lagerung in Flüssigstickstoff erfolgte. Allerdings vergingen von den ersten bis zu diesen Experimenten fast vier Monate, ein Zeitraum, in dem sich die Lymphozyten durchaus qualitativ verändern könnten, auch wenn die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen nicht merklich verschieden war.

Tab. 3.5 Bedingungen zur parallelen Austestung für eine Expansion HPV 16-spezifischer CD8⁺CD137⁺ T-Zellen

Bedingung	Zytokine	Verhältnis "Beads" zu Zellen
A	Proleukin [®] 200 IU/ml, IL-7 10 U/mL	1:2
B	IL-15 10 U/mL, IL-21 0,3 U/mL	1:5
C	Proleukin [®] 200 IU/ml, IL-7 10 U/mL	---
D	IL-15 20 U/mL, IL-21 0,6 U/mL	1:2
E		1:5

Getestet wurden verschiedene Konzentrationen der Zytokine IL-15 und IL-21 und verschiedene Verhältnisse an "Beads" zu Zellen. Bei diesen Ansätzen wurden die "Beads" nicht aus den Kulturen entfernt, da die Zellzahlen über den Expansionszeitraum hinweg nur wenig zunahmen (siehe Abb. 3.17).

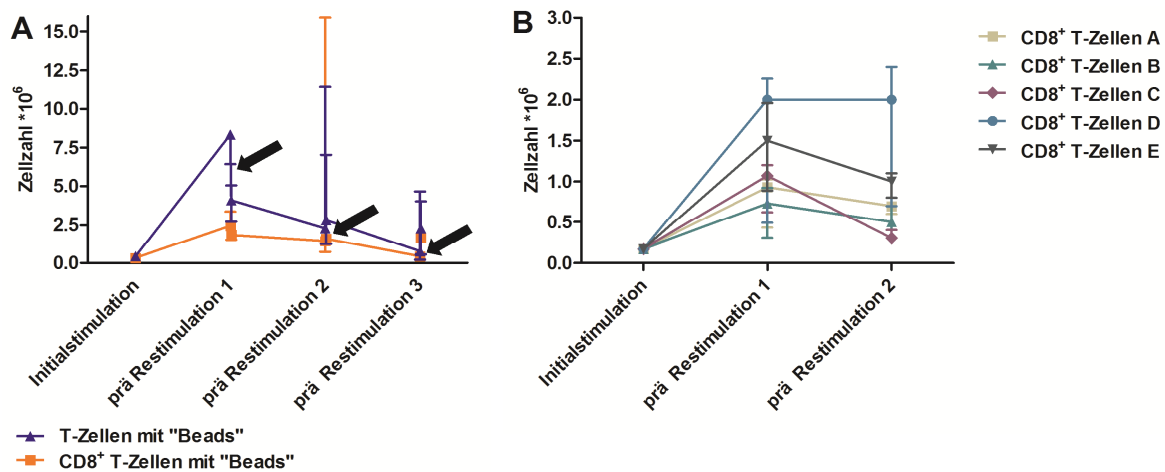


Abb. 3.17 Optimierung HPV 16-spezifischer Expansionen mit "Beads" als scaffold Reagenzien.

Dargestellt sind mediane Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*). **A)** Das Entfernen der magnetischen MACSiBead Particles mittels des magnetischen Felds des MACSiMAG Separator führte zu einem starken Einbruch des Zellwachstums (siehe Pfeile), besonders bei der Expansion der T-Zellen. Die Zellzahlen nahmen über den Zeitraum der Expansion derart maßgeblich ab, dass nach 24 Tagen fast wieder das Ausgangsniveau erreicht war (prä Restimulation 3). **B)** Das parallele Austesten verschiedener Kulturbedingungen zeigte, dass eine höhere Konzentration an IL-15 und IL-21 sowie das Verhältnis Beads zu Zellen 1:2 (Bedingung D) günstiger für das Zellwachstum zu sein scheint, als eine niedrigere Konzentration der genannten Zytokine (Bedingungen A und B) oder ein Verhältnis Beads zu Zellen von 1:5 (Bedingungen B und E) oder auch eine höhere Konzentration an IL-15 und IL-21 ohne "Beads" (Bedingung C). Die Auflistung der Bedingungen ist in Tab. 3.5 (S. 59) zu finden. Das Wachstum der CD8⁺CD137⁺ T-Zellen verlief in diesen Experimenten insgesamt deutlich schwächer, als in den vorherigen (siehe Abb. 3.15 A (S. 56), Abb. 3.17 A (S. 60) und 3.19 A (S. 66)). Aus diesem Grund wurde aus diesen Ansätzen die "Beads" nicht entfernt und keine Funktionstestungen nach Expansionsende durchgeführt.

Um eine Beeinflussung der Lagerung auf die Qualität des Zellwachstums auszuschließen, wurden die darauffolgenden Experimente mit frisch isolierten Lymphozyten durchgeführt. Die Lymphozyten wurden hierfür direkt nach Isolation mit HPV 16 E6 und E7 über Nacht stimuliert und anschließend zuerst CD8⁺ T-Zellen mittels Negativisolation angereichert gefolgt von Anreicherung CD137⁺ T-Zellen mittels Positivisolation (N = 3). Das Wachstum dieser CD8⁺CD137⁺ T-Zellen unter den optimierten Expansionsbedingungen (optimiertes Expansionsmedium TexMACSTM plus Proleukin[®], IL-7, IL-15 (20 U/mL) und IL-21 (0,6 U/mL), sowie Zusatz von "Beads" im Verhältnis "Beads" zu Zellen 1:2) war erneut eindeutig besser als das Wachstum der CD8⁺CD137⁺ T-Zellen der in Abb. 3.17 B gezeigten Versuche. Dies zeigte sich in mikroskopischen Aufnahmen an Tag 5 und Tag 14 (Abb. 3.18 B), sowie der Messung der Zellzahlen (Abb. 3.18 A). Das Entfernen der "Beads" an Tag 16 nach Expansionsbeginn (= prä Restimulation 2) führte zu nur wenig Verlusten, jedoch reduzierte sich die Zellzahl während der Ruhephase deutlich. Da die Möglichkeit bestand, dass die zugesetzten "Beads" in Funktions- und Spezifitätstestungen die Reaktion der CD8⁺CD137⁺ T-Zellen beeinflussen konnten, wurde zu zwei Zeitpunkten ELISpot-Assays durchgeführt, zu denen sich keine "Beads" in den Kulturen befanden: initial vor Zusatz der "Beads" und nach der Ruhephase nach Entfernen der "Beads". In diesen Ansätzen wurden die Zellen getrennt mit HPV 16 E6 und E7 stimuliert, um nachzuvollziehen, wie die Reaktionen initial aussahen und ob und wie sie sich im Laufe der Expansion veränderten.

Für die Expansionsphase wurden die $CD8^+CD137^+$ T-Zellen weiterhin mit HPV 16 E6 und E7 im Verhältnis 1:1 kostimuliert. Auch für dieses Expansionsprotokoll zeigte sich keine herunter regulierende Immunantwort, die Zahl der Zellen, die HPV 16-spezifisch IL-10 sezernierten blieb unter den Werten der Negativkontrolle, bzw. nicht-restimulierter Zellen (Abb. 3.18 D). Während sich die Sekretion von Perforin über die Expansion hinweg nur unwesentlich änderte (Abb. 3.18 F), blieb die zu Beginn vorhandene leicht höhere HPV 16 E7-spezifische Sekretion von IFN- γ nicht erhalten (Abb. 3.18 C) und auch die initiale HPV 16 E6 und E7-spezifische Sekretion von Granzym B wandelte sich nach Expansion in eine unspezifische Reaktion (Abb. 3.18 E). Alles in allem war erneut keine eindeutig HPV 16-spezifische Reaktion expandierter Zellen messbar.

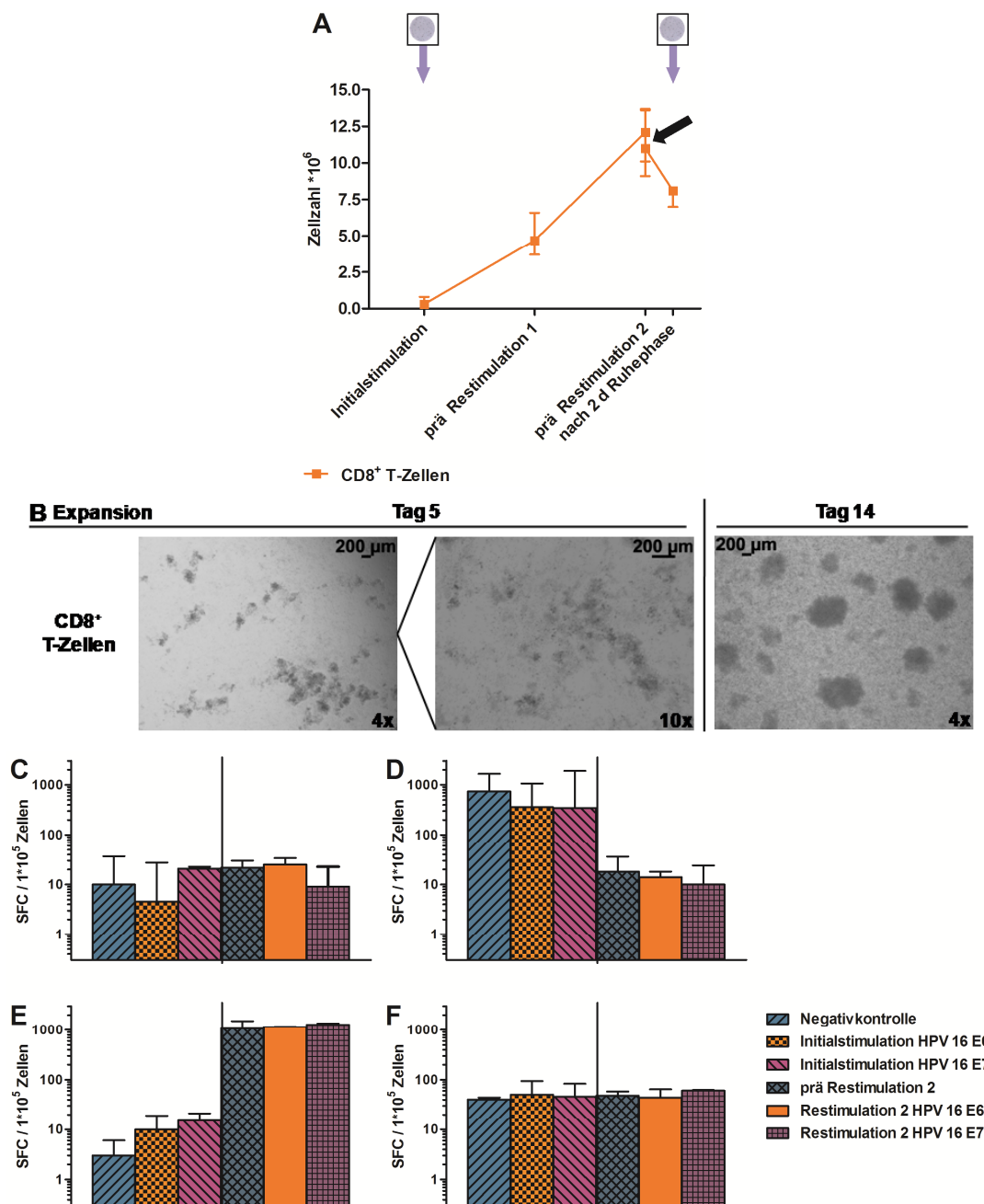


Abb. 3.18 HPV 16-spezifische Expansion von $CD8^+CD137^+$ T-Zellen unter optimierten Bedingungen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" als *scaffold* Reagenzien. In diesen

Versuchen (N = 3) kamen frisch isolierte Lymphozyten statt kryokonservierter zum Einsatz. Daneben wurde die Konzentration von IL-15 und IL-21 auf das Doppelte erhöht. Das Verhältnis von "Beads" zu Zellen betrug 1:2. **A)** Darstellung der medianen Zellzahlen mit IQR (*Interquartile Ranges*) über den gesamten Expansionszeitraum hinweg. Die Messzeitpunkte entsprachen Tag null (= Initialstimulation), bzw. vor den Ruhephasen der Restimulationen an Tag 7 (= prä Restimulation 1), Tag 16 (= prä Restimulation 2) und Tag 26 (= nach zwei Tagen (d) Ruhephase). Über den Zeitraum hinweg war eine deutliche Zunahme der Zellzahlen messbar, jedoch nahm diese in der Ruhephase nach dem erfolgreichen Entfernen der "Beads" ab. **B)** Mikroskopische Aufnahmen der Kulturen in den Vergrößerungen 4x (Bilder links und rechts) und 10x (Bild Mitte). Zu Beginn (Tag 5) waren erneut eher kleinere, aber viele Kolonien sichtbar. Die Größe der Kolonien nahm bis Tag 14 deutlich zu, es spiegelten sich optisch die gemessenen Zellzahlen deutlich wider. **C - F)** Parallele Analyse der Sekretion von IFN- γ (**C**), IL-10 (**D**), Granzym B (**E**) und Perforin (**F**) mittels ELISpot-Assays. Für diese Assays wurden die Zellen getrennt mit HPV 16 E6 oder E7 (re)stimuliert, um die Reaktionen der Zellen auf die einzelnen Peptidmische zu analysieren. Analysiert wurden die Zellen zu Zeitpunkten, zu denen sich keine "Beads" in den Kulturen befanden: vor Expansionsbeginn und nach der Ruhephase nach dem Entfernen der Beads (siehe Pfeile in **A**). Für einen besseren Vergleich zwischen den Zytokinen / zytotoxischen Proteinen wurde auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet [SFC (*Spot Forming Cells*) / $1 \cdot 10^5$ Zellen]. Dargestellt wurden die medianen Werte mit IQR. Jegliche initial vorhandenen HPV 16 E6 oder E7-spezifischen Reaktionen verloren sich nach der Expansion CD8⁺CD137⁺ T-Zellen, sowohl bei Sekretion von IFN- γ als auch bei Granzym B. Die Sekretion von Perforin änderte sich über die Zeit der Expansion nur marginal. Die Zahl der Zellen, die IL-10 sezernierten, zeigte an, dass sich wiederum keine herunter regulierende Immunantwort entwickelte.

3.3.4. Scaffold Reagenzien: "Beads" vs. TransAct Reagent

Die bisher gezeigten Experimente führten nicht zur Expansion HPV-spezifischer Zellen. Dies mochte hauptsächlich an zwei Dingen gelegen haben: die niedrige Zahl an T-Zellen, die sich initial mit den Peptidmischen HPV 16 E6 und E7 stimulieren ließen, zusammen mit der unspezifischen Stimulation durch die CD3- und CD28-Antikörper auf den MACSiBead Particles. Außerdem schien das Entfernen der "Beads" mittels des magnetischen Felds des MACSiMAG Separators den Einbruch der Zellzahlen nach sich zu ziehen. Um dies zu überprüfen, wurde neben den Beads ein weiteres *scaffold* Reagenz getestet, das TransAct Reagent. Dieses Reagenz wurde freundlicherweise von Miltenyi Biotec zur Verfügung gestellt, es sind "Eisenkristalle, die in eine biokompatible Polysaccharid-Matrix eingebettet sind mit einem Gesamtdurchmesser von ca. 100 nm. Antikörper (...) sind kovalent an die Matrix gebunden" (Casati, et al., 2013). Der Vorteil von diesem Reagenz ist, dass ungebundenes Reagenz aus der Kultur durch einfache Zentrifugation der Suspension entfernt werden kann (Casati, et al., 2013). Zur Verfügung gestellt wurden zwei Matrizen, eine gebunden an CD3-Antikörper (Klon OKT3), die andere an CD28-Antikörper (Klon 15E8). Verwendet wurden die TransAct Reagents im Verhältnis 1:1, sie wurden jeweils kurz vor Zugabe zur expandierenden Kultur gemischt und anschließend im Verhältnis 1:200 bzw. 1:500 zur Kultur gegeben (bei $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL). Das Expansionsprotokoll wurde dahingehend geändert, dass weiterhin frisch isolierte Lymphozyten über Nacht mit Peptidmischen stimuliert wurden, jedoch nicht in Kostimulation von HPV 16 E6 und E7, sondern in getrennten Ansätzen. Aus diesen Gründen wurde neben dem Verhältnis "Beads" zu Zellen 1:2 nochmal das Verhältnis 1:5 getestet, um die Auswirkungen in den Expansionen nach Einzelstimulationen zu analysieren. Weiterhin wurde zusätzlich getestet, ob und wenn

ja welchen Unterschied der Zusatz des entsprechend für die Stimulation verwendete Peptidmix während der Expansionsphase ausmacht im Vergleich zum bisherigen Protokoll, in welchem für die Expansionsphase kein Peptidmix zusätzlich zugesetzt wurde. Zusammengefasst wurden frisch isolierte Lymphozyten über Nacht mit HPV 16 E6 oder E7 stimuliert, bevor CD8⁺ T-Zellen mittels Negativselektion isoliert und unter verschiedenen Bedingungen parallel getestet wurden: Stimulation mit HPV 16 E6 oder E7, jeweils mit oder ohne zusätzlicher Gabe von Peptidmix während der Expansion und Zusatz von "Beads" im Verhältnis 1:2 oder 1:5 zu Zellen oder TransAct Reagent im Verhältnis 1:200 oder 1:500 (siehe Tab. 3.6). Um das Wachstum der Kulturen umfassender zu verfolgen, wurden die Zellzahlen zusätzlich zu den bisherigen Zeitpunkten - vor Restimulation und nach Entfernung der "Beads" - zwei Mal während der Expansionsrunden bestimmt (Abb. 3.19 A - D). Bisher wurde dies vermieden, da die sich entwickelten Kolonien ungehindert wachsen können sollten, während für eine verlässliche Bestimmung der Zellzahl eine möglichst gute Vereinzelung der Zellen vonnöten war.

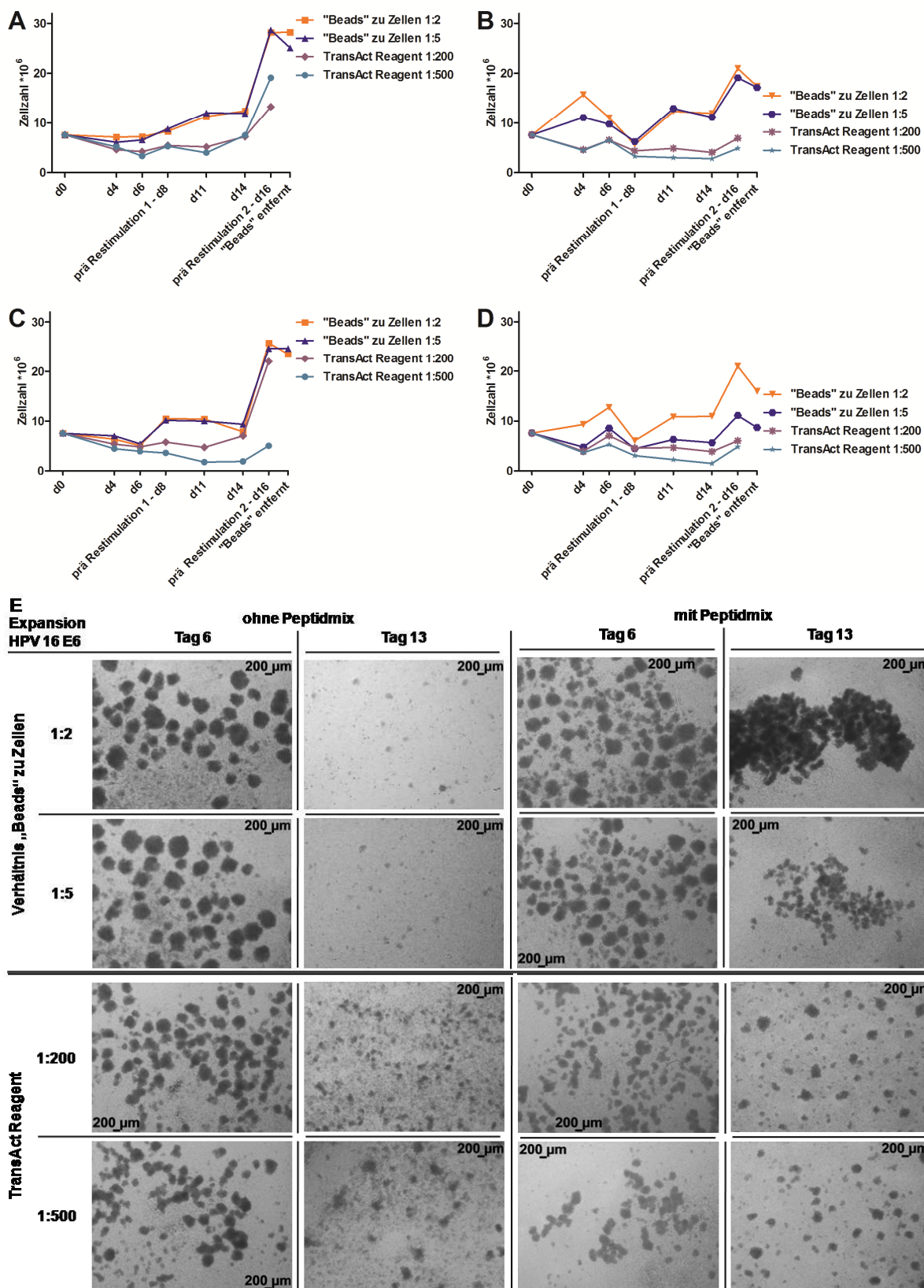
Tab. 3.6 Übersicht der Bedingungen zur Expansion HPV 16 E6- oder E7-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Stimulation HPV 16	Peptidmix während Expansion	"Beads" zu Zellen	TransAct Reagent
E6	Nein	1:2	---
		1:5	---
		---	1:200
		---	1:500
	Ja	1:2	---
		1:5	---
		---	1:200
		---	1:500
E7	Nein	1:2	---
		1:5	---
		---	1:200
		---	1:500
	Ja	1:2	---
		1:5	---
		---	1:200
		---	1:500

Die aufgeführten Bedingungen wurden parallel mit frisch isolierten Lymphozyten eines Spenders durchgeführt. Die Lymphozyten wurden ON stimuliert, bevor CD8⁺ T-Zellen mittels Negativisolation angereichert und unter den verschiedenen Bedingungen in Expansion gegeben wurden. Nach der Restimulation der Kulturen wurde in den entsprechenden Ansätzen frisches TransAct Reagent zugesetzt.

In allen Ansätzen mit "Beads" nahm die Zellzahl über den Expansionszeitraum hinweg deutlich zu (Abb. 3.19 A - D), wobei kaum Unterschiede zwischen Ansätzen mit dem Verhältnis "Beads" zu Zellen 1:2 oder 1:5 messbar waren (Ausnahme: Ansätze mit Peptidmix

während Expansionsphase nach Stimulation mit HPV 16 E7, hier nahm die Zellzahl beim Verhältnis "Beads" zu Zellen 1:5 insgesamt nur unwesentlich zu (Abb. 3.19 D)). Bei den Ansätzen mit TransAct Reagent war nur bei folgenden Ansätzen ein insgesamt positives Wachstum zu verzeichnen: Ohne Peptidmix während der Expansionsphase nach Stimulation mit HPV 16 E6, Zugabe 1:200 und 1:500, und ohne Peptidmix während der Expansionsphase nach Stimulation mit HPV 16 E7, Zugabe 1:200 (Abb. 3.19 A und C). In den restlichen Ansätzen nahm die Zellzahl zunächst ab und stieg erst in der zweiten Expansionsrunde annähernd wieder auf das Ausgangsniveau von Tag null. Hierin unterschied sich die Expansion mit TransAct Reagent sowohl von den Ansätzen mit "Beads" als auch von Expansionsexperimenten ohne *scaffold* Reagenzien, in denen die Zellzahlen der Kulturen kontinuierlich abnahmen (Abb. 3.13). Das Entfernen der "Beads" nach zwei Runden Expansion führte wiederum in fast allen Ansätzen zu einem Verlust in unterschiedlichen Ausmaßen von ungefähr $2 - 5 \cdot 10^6$ Zellen. Mikroskopische Aufnahmen der Kulturen an Tag 6 und 13 spiegelten die gemessenen Zellzahlen nur bedingt wider.



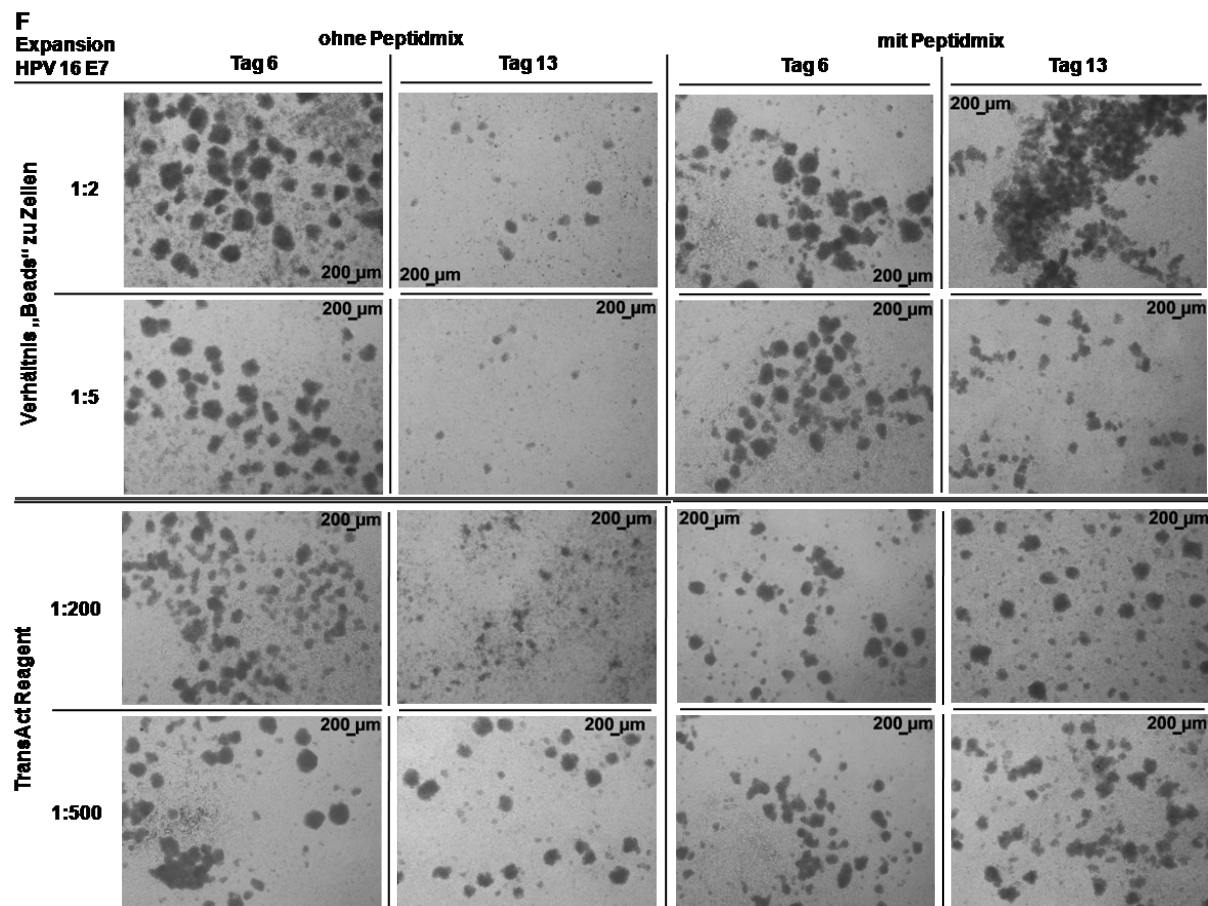
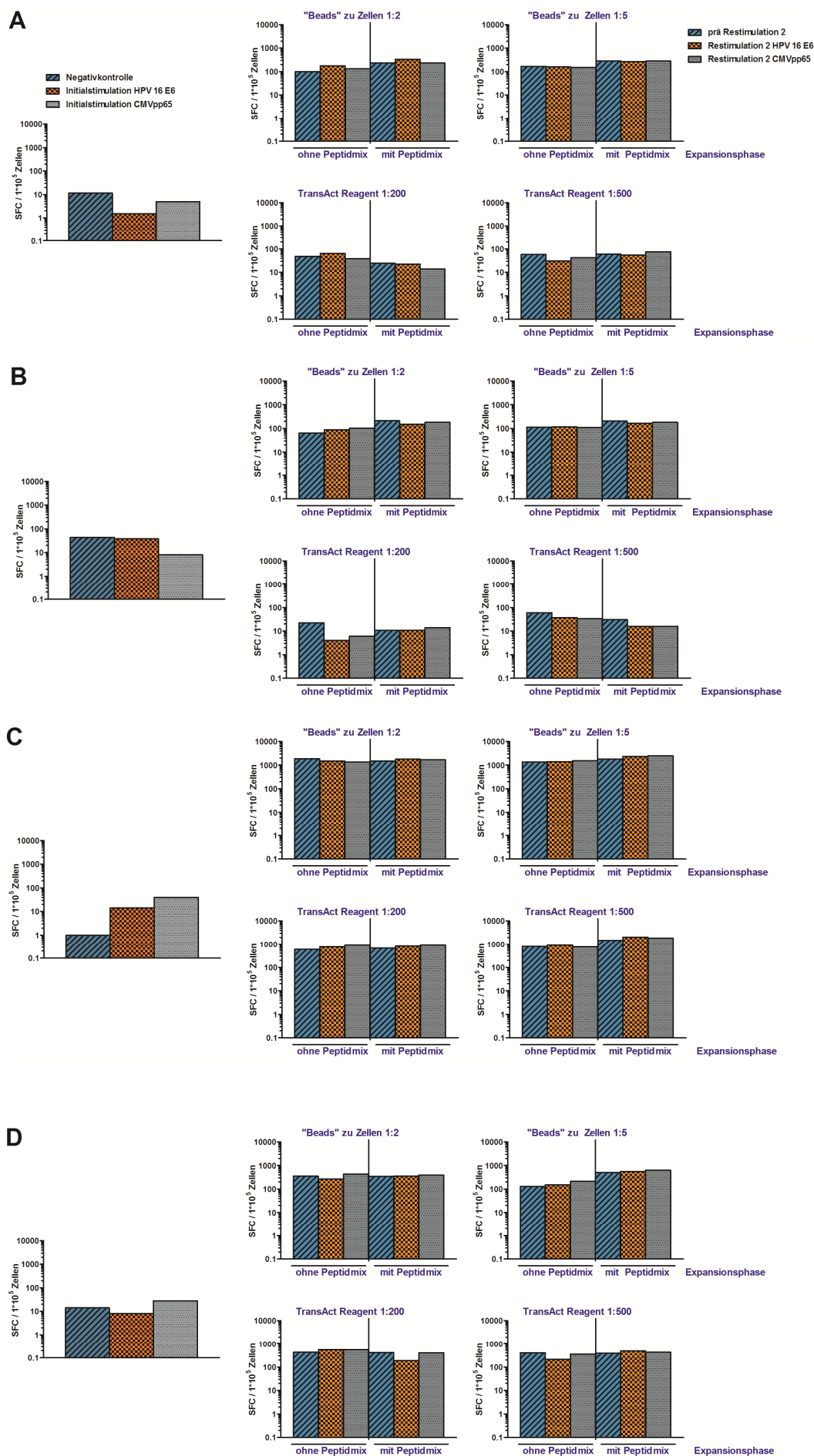


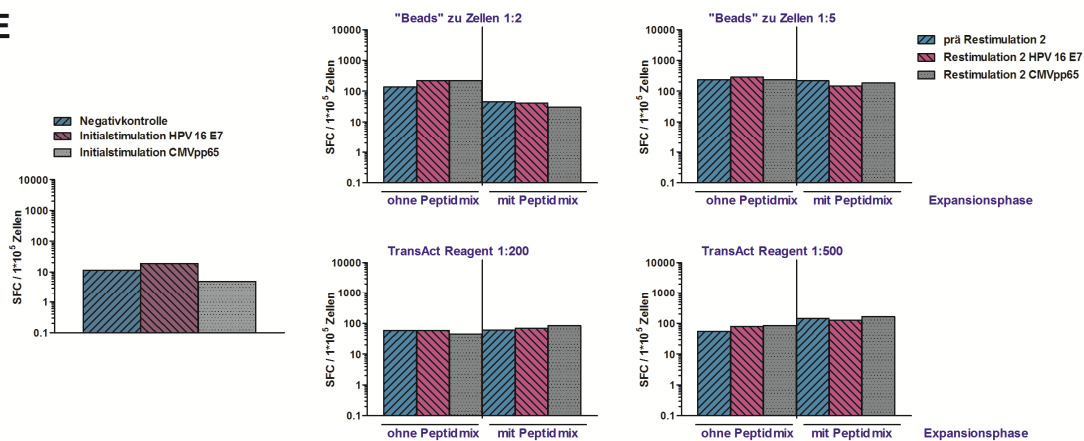
Abb. 3.19 HPV 16-spezifische Expansion von CD8⁺ T-Zellen unter optimierten Bedingungen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" oder TransAct Reagent als *scaffold* Reagenzien. In diesem Versuch (N = 1) kamen weiterhin frisch isolierte Lymphozyten zum Einsatz, die allerdings einzeln mit HPV 16 E6 oder E7 über Nacht stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden CD8⁺ T-Zellen mittels Negativisolation angereichert und unter den in Tab. 3.6 (S. 63) angegebenen Bedingungen in Expansion gegeben. Die Konzentration der Zytokine entsprach der zuletzt als günstigste bestimmten. **A - D**) Darstellung der medianen Zellzahlen mit IQR (*Interquartile Ranges*) über den gesamten Expansionszeitraum. In den Ansätzen mit "Beads" nahmen die Zellzahlen über die Expansion hinweg deutlich zu, es gab nur unwesentliche Unterschiede zwischen den Ansätzen mit "Beads" zu Zellen 1:2 oder 1:5. Das Entfernen der "Beads" nach zwei Runden Expansion ging in fast allen Fällen mit einem Verlust an Zellen zwischen $2 - 5 \cdot 10^6$ Zellen einher. Expansionsphasen ohne den Zusatz der jeweiligen Peptidmixe führten zu höheren Zellzahlen, als die Expansionsphasen mit Zusatz der Peptidmixe. Der Zusatz von TransAct Reagent führte in lediglich drei Fällen zu einem messbaren Zellwachstum: Ansätze ohne Peptidmix während der Expansionsphase, TransAct Reagent 1:200 bei Stimulation mit HPV 16 E6 (**A**) oder E7 (**C**), außerdem bei Stimulation mit HPV 16 E6 der Zusatz von TransAct Reagent 1:500 (**A**). In den anderen Ansätzen führte der Zusatz von TransAct Reagent lediglich dazu, dass die Zellzahlen nach zwei Runden Expansion ungefähr dem Ausgangsniveau an Tag 0 (= d0) entsprachen. **E - F**) Mikroskopische Aufnahmen der Kulturen in 4x Vergrößerung. Die gemessenen Zellzahlen spiegelten sich in den Aufnahmen nur bedingt wider. In den Aufnahmen der Kulturen mit TransAct Reagent war sichtbar, dass eine deutliche Zahl an Kolonien anwuchsen (Bilder Tag 6), diese jedoch bis Tag 13 nicht deutlich größer wurden. Vom Eindruck her schienen jedoch die Kulturen mit Peptidmix während der Expansionsphase besser zu wachsen. Noch widersprüchlicher waren die Aufnahmen der Kulturen mit "Beads", hier schienen die Kulturen eher ab- als zuzunehmen. Des Weiteren erweckten auch hier die Ansätze mit Peptidmix während der Expansionsphase den Eindruck, deutlich besser zu wachsen als die Kulturen ohne zusätzliche Peptidmixe.

Die Bilder der Aufnahmen von Kulturen mit TransAct Reagent gaben die Zellzahlen gut wider, es war eindeutig zu sehen, dass durchaus viele Kolonien anwuchsen, diese jedoch relativ klein blieben. Widersprüchlich dazu standen die Aufnahmen der Kulturen mit "Beads", vor allem der Ansätze ohne Peptidmix während Expansionsphase. Hier waren an Tag 6 sehr

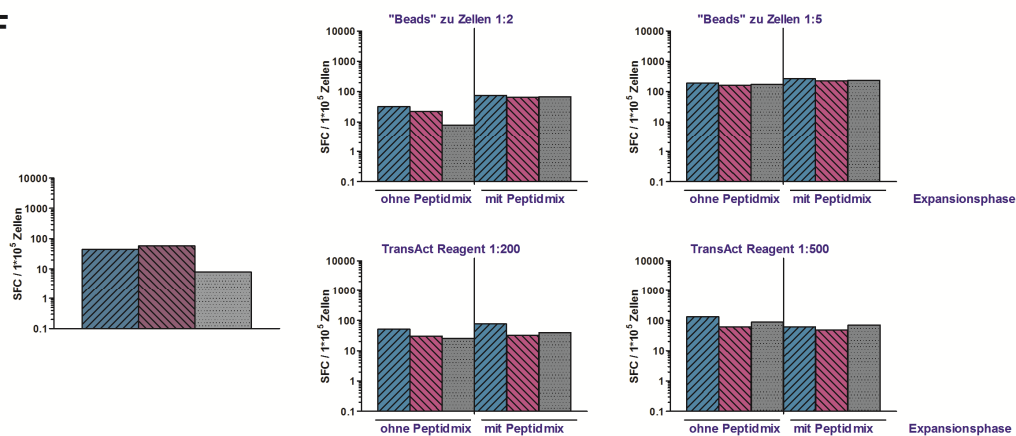
deutlich gut wachsende Kolonien sichtbar, an Tag 13 waren jedoch nur noch wenige kleine Kolonien sichtbar, wobei die gemessenen Zellzahlen an Tag 14 eindeutig andere Ergebnisse lieferten. Bei den Ansätzen mit Peptidmix während Expansionsphase entstand durch die Aufnahmen an Tag 14 der Eindruck, dass deutlich mehr Zellen in den Kulturen vorhanden hätten sein müssen, als letztendlich gemessen wurden. Alles in allem zeigten die Aufnahmen, dass der Zusatz sowohl von "Beads" als auch von TransAct Reagent zu Koloniebildung CD8⁺ T-Zellen führt. Die Zellzahlen waren in jedem Fall ausreichend, um nach Expansionsende ausgiebige Spezifitäts- und Funktionstestungen durchzuführen. So konnten von allen Kulturen parallel IFN- γ (Abb. 3.20 A, E), IL-10 (Abb. 3.20 B, F), Granzym B (Abb. 3.20 D, G) und Perforin (Abb. 3.20 E, H) in optimierten ELISpot-Assays gemessen werden. Außerdem wurden alle Ansätze im Zytotoxizitätstest EuTDA-Assay eingesetzt (Abb. 3.20 I - P), wenngleich in einigen Ansätzen nur die niedrigsten zwei oder drei Ratios möglich waren (Abb. 3.20 K - P). Die Ergebnisse der ELISpot-Analysen aller Ansätze waren im Detail sehr heterogen, einerlei, ob die Stimulation mit HPV 16 E6 (Abb. 3.20 A - E) oder E7 (Abb. 3.20 F - H) erfolgte und zusätzlich Peptidmix während der Expansionsphase zugesetzt wurde oder nicht. Teils waren die Zellzahlen, die das gemessene Zytokin oder zytotoxische Protein sezernierten, in Ansätzen mit Peptidmix während der Expansion höher, teils war die Zahl an sezernierenden Zellen in den Ansätzen mit "Beads" insgesamt höher und teilweise war es genau umgekehrt. Alle Ansätze hatten gemein, dass sich in den expandierten CD8⁺ T-Zellen keine HPV 16-spezifische Sekretion von Zytokinen oder zytotoxischen Proteinen nachweisen ließ. Zwar war auch keine spezifische Reaktion auf die Kontrollstimulation mit CMVpp65 messbar, allerdings deutete dies in diesem Fall lediglich darauf hin, dass die CD8⁺ T-Zellen sowohl durch die zugesetzten "Beads", als auch das zugesetzte TransAct Reagent jegliche vorhandene Spezifität verloren haben und unspezifisch Zytokine und zytotoxische Proteine sezernierten. Dieses Bild setzte sich in den Ergebnissen der Zytotoxizitätsmessung größtenteils fort. Es zeigte sich, dass die expandierten CD8⁺ T-Zellen durchaus zytotoxisches Potential hatten, besonderen bei den höheren Ratios an Effektor- zu Zielzellen von 40:1 und 80:1, auch wenn in den ELISpot-Assays keine spezifische Sekretion von Granzym B oder Perforin zu verzeichnen war (Abb. 3.20 C, G). Gleichzeitig waren auch hier sehr heterogene Reaktionen auszumachen, mal führten Zellen, die mit "Beads" expandiert wurden, zu höheren Werten an freigesetztem TDA, mal waren es Zellen, die mit TransAct Reagent expandiert wurden, unabhängig davon, ob mit HPV 16 E6 oder E7 stimuliert wurde oder ob Peptidmix während der Expansionsphase zugesetzt war oder nicht. Ein Vergleich der zellspezifischen Reaktionen der expandierten Zellen auf die HPV 16-negative Zell-Linie, UT-SCC-050, und die HPV 16-positive Zell-Linie, UPCI-SCC-090, zeigte jedoch, dass die zytotoxischen T-Zellen auf beide Zell-Linien reagierten, teilweise sogar mit höheren Werten der prozentualen Freisetzung auf die HPV 16-negative. Damit zeigte sich auch hier keine HPV 16-spezifische Reaktion der expandierten CD8⁺ T-Zellen.



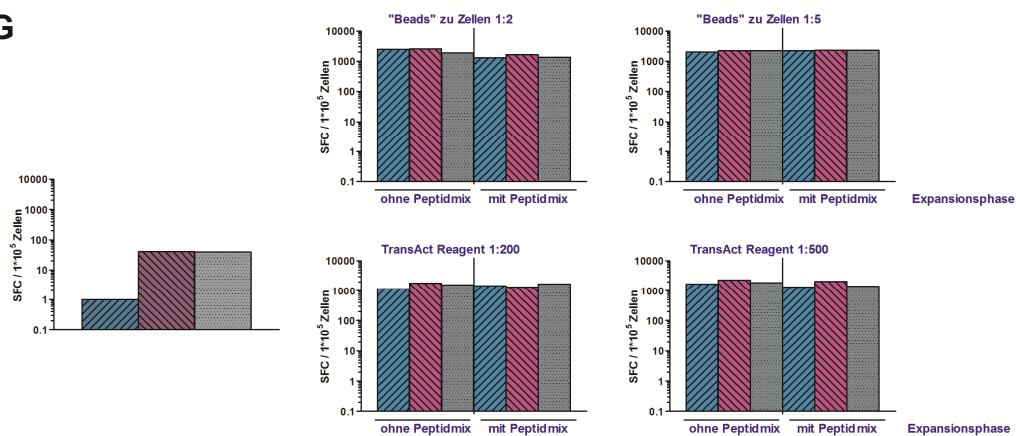
E



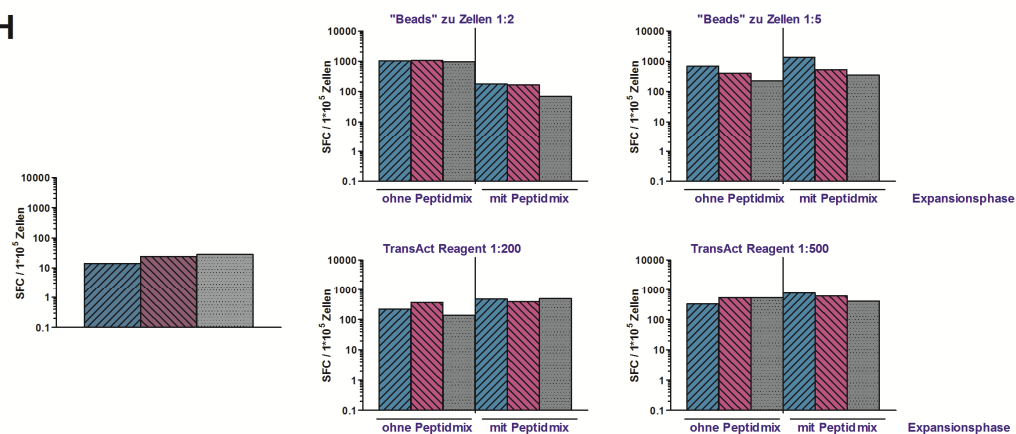
F



G



H



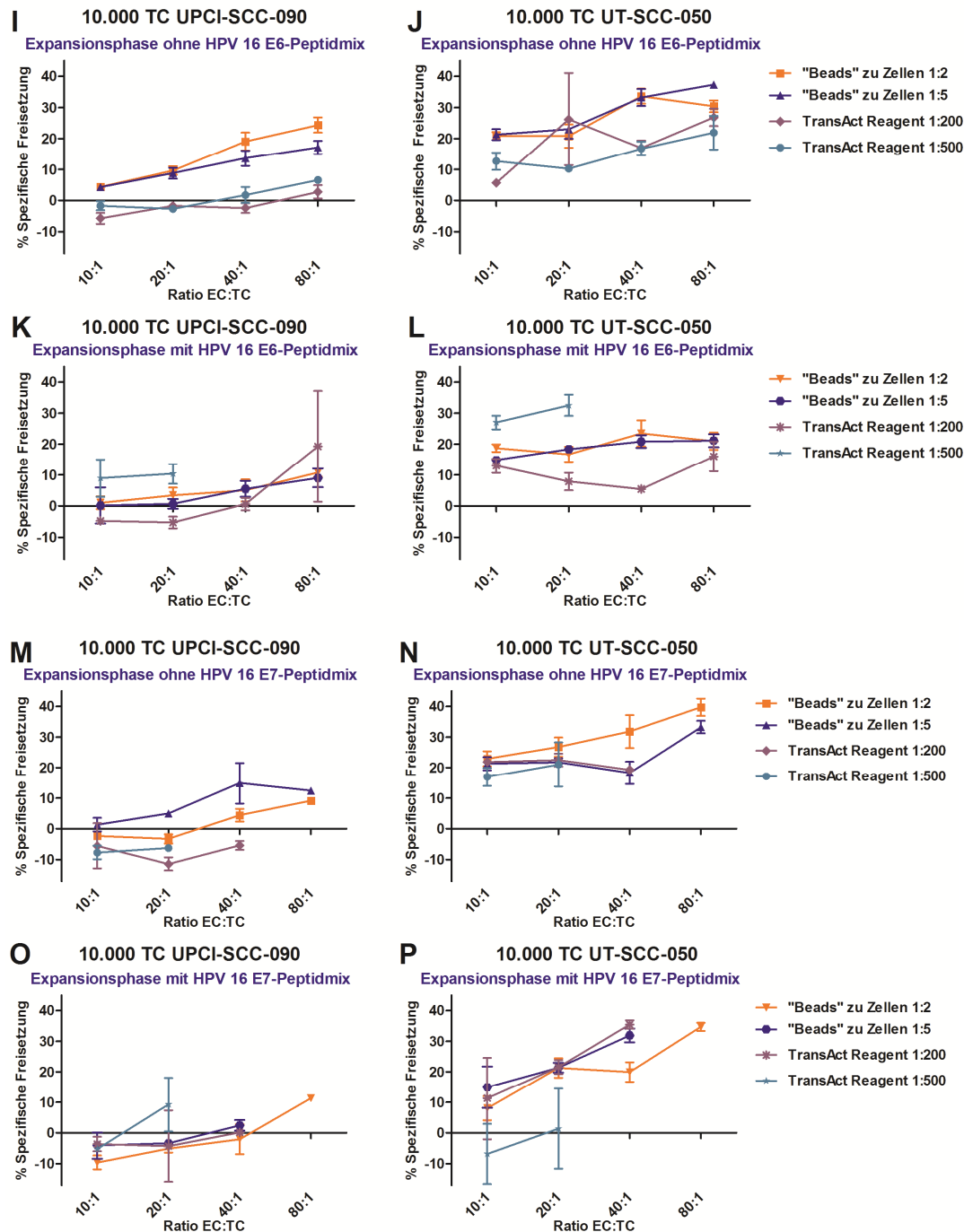


Abb. 3.20 Funktions- und Spezifitätsanalyse HPV 16-spezifisch expandierter CD8⁺ T-Zellen unter optimierten Bedingungen bei Peptidmix-Stimulation und "Beads" oder TransAct Reagent als *scaffold* Reagenzien. Die nach Einzelstimulation mit HPV 16 E6 oder E7 expandierten CD8⁺ T-Zellen wurden in ELISpot-Assays auf ihre Funktionsfähigkeit und Spezifität gegen HPV 16 E6, bzw. E7 getestet (A - H). Dargestellt sind mediane Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*). Das mögliche zytotoxische Potenzial wurde nach Expansionsende in EuTDA-Assays mit UPCI-SCC-090 und UT-SCC-050 als Zielzellen getestet (I - P). Hier sind die Mediane der pipettierten Dreifachansätze mit Min/Max-Messbereich dargestellt, da die Werte innerhalb des Experiments teilweise stark schwankten. In parallelen Ansätzen wurde die Sekretion von IFN- γ (A, E), IL-10 (B, F), Granzym B (C, G) und Perforin (D, H) vor und nach Stimulation, bzw. Restimulation mit HPV 16 E6 (A - E), bzw. E7 (F - H) gemessen. Auf Grund ausreichender Zellzahlen wurde zur Kontrolle CMVpp65 Peptidmix eingesetzt, um zu überprüfen, wie HPV 16-spezifisch expandierte CD8⁺ T-Zellen einer CMV-negativ getesteten Person in einer Negativkontrolle ("Nonsens-Stimulation") reagierten. Die Reaktionen der expandierten CD8⁺ T-Zellen waren sehr heterogen. Alles in allem verloren sich sämtliche vor Expansion gemessenen spezifischen Reaktionen (Panel links), es ergab sich keine deutlich messbare spezifische Sekretion von Zytokinen oder zytotoxischen Proteinen, weder bei Restimulation mit HPV

16 E6 noch E7. Die Zellzahlen der jeweiligen Kontrollstimulation mit CMVpp65 bewegten sich in ähnlichem Rahmen, wie die Zahlen der nicht oder mit HPV 16 E6 bzw. E7 restimulierten Zellen, was auf eine eindeutig unspezifische Sekretion von Zytokinen und zytotoxischen Proteinen der expandierten CD8⁺ T-Zellen hinwies. In den EuTDA-Assays war auf den ersten Blick ein zytotoxisches Potenzial der expandierten CD8⁺ T-Zellen erkennen, da - vor allem bei höheren Ratios von Effektor- zu Zielzellen von 40:1 und 80:1 - eine deutliche prozentuale spezifische Freisetzung von TDA messbar war. Jedoch war auch diese Reaktion nicht HPV 16-spezifisch, da sowohl die HPV 16-positive Zell-Linie UPCI-SCC-090 (**I, K, M, O**) als auch die HPV 16-negative Linie UT-SCC-050 (**J, L, N, P**) lysiert wurden. In fast allen Ansätzen mit UT-SCC-050 als Zielzellen lag die prozentuale spezifische Freisetzung sogar höher, als in den parallel angesetzten Ansätzen mit UPCI-SCC-090 als Zielzellen. Zusammengefasst war es auch unter diesen Bedingungen nicht möglich, HPV 16-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu expandieren, weder mit "Beads", noch mit TransAct Reagent als *scaffold* Reagenzien. Auch der Zusatz von Peptidmix während der Expansionsphase führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

3.3.5. *Scaffold* Reagenzien: aktivierte B-Zellen

Da die artifiziellen Reagenzien lediglich zu einer unspezifischen Expansion von T-Zellen führten und eine Expansion ohne *scaffold* Reagenzien nicht möglich war, wurde nach einer möglichen Alternative gesucht, autologe Lymphozyten zur Expansion HPV 16-spezifische T-Zellen zu verwenden. Die Verwendung der naheliegendsten APC, der dendritischen Zellen, wurde ausgeschlossen, da aus veröffentlichten Protokollen zur Expansion HPV-spezifischer Zellen deutlich wurde, dass die Expansion dieser Zellen einen langen Zeitraum und mehrere Restimulationen erforderte (Ramos, et al., 2013; Schreurs, Scholten, Kueter, Ruizendaal, Meijer, & Hooijberg, 2003; Zentz, et al., 2007). Eine Verwendung autologer dendritischer Zellen hätte vorausgesetzt, dass die dendritischen Zellen für jede Stimulation frisch aus Monozyten hätten generiert werden müssen (Berger & Schultz, 2003; Ramos, et al., 2013; Schultz, et al., 2004; Vannucchi, Glinz, Bosi, Caporale, & Rossi-Ferrini, 2001). Dafür hätte der Spender, dessen T-Zellen sich in Expansion befanden, weiterhin zur Blutabnahme zur Verfügung stehen müssen, da nach eigenen Erfahrungen nur wenige Monozyten den Kryokonservierungsprozess überstehen. Durch den logistischen und monetären Aufwand, den die Verwendung dendritischer Zellen bedeuten würde, rückte eine andere Population an Lymphozyten in den Vordergrund, die ebenfalls zur Gruppe der APC zählt: aktivierte B-Zellen. Veröffentlichten Protokollen zufolge ließen sich aktivierte B-Zellen erfolgreich mit Peptiden beladen und zur spezifischen Expansion von T-Zellen einsetzen (Ahmadi, Flies, Efebera, & Sherr, 2008; Ramos, et al., 2013; Zentz, et al., 2007). Aktivierte B-Zellen lassen sich auf unterschiedliche Weise generieren, die effektivsten Methoden sind die Verwendung bestrahlter, retroviral mit CD40L transduzierten Mausfibroblasten, vorzugsweise einer etablierten Zell-Linie (Ahmadi, Flies, Efebera, & Sherr, 2008; Ramos, et al., 2013; Zentz, et al., 2007), oder die Transformation mit EBV (Schreurs, Scholten, Kueter, Ruizendaal, Meijer, & Hooijberg, 2003; Sun, et al., 1999; Tosato & Cohen, 2007). Keine der beiden genannten Methoden ist GMP-konform umsetzbar, jedoch sollte dies einem Austesten der Verwendung aktivierter B-Zellen für die Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen nicht im Wege stehen, da die bisher getesteten GMP umsetzbaren Möglichkeiten

nicht den gewünschten Erfolg erzielen. So wurde die Verwendung EBV-transformierter B-Lymphoblasten-Zell-Linien (B-LCL, *B-Lymphoblastoid Cell Lines*) für die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen ins Auge gefasst, da bereits 1999 von einer erfolgreichen Anwendung Peptid-beladener B-LCL zur Expansion CMV- und EBV-spezifischer zytotoxischer Lymphozyten berichtet wurde (Sun, et al., 1999). Der virushaltige Überstand, der für die Transformation benötigt wurde, wurde zusammen mit einem Transformationsprotokoll freundlicherweise vom Institut für Zelltherapeutische Forschung, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt. Von Buffy Coats gesunder Spender (N = 3) wurde nach Protokoll aus einem Teil der frisch isolierten Lymphozyten EBV-transformierte B-LCL generiert und mehrere Wochen expandiert, während die Lymphozyten, die nicht für die Transformation verwendet wurden, kryokonserviert wurden. In Abb. 3.21 A wurden von einer der B-LCL Kulturen beispielhaft mikroskopische Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen, um die B-LCL Klone zu zeigen. Durchflusszytometrische Analysen der Standardmarker für Lymphozyten, wie sie in Abb. 3.10 getestet wurden, zeigten, dass es sich nach acht Wochen Expansion bei den wachsenden Zellen um reine B-Zellkulturen handelte. Um zu analysieren, ob sich die EBV-transformierten B-LCL für die Stimulation und Expansion HPV 16-spezifischer CD8⁺ T-Zellen eigneten, wurden autologe kryokonservierte Lymphozyten aufgetaut und nach einer 24-stündigen Ruhephase CD8⁺ T-Zellen mittels Negativisolation angereichert. Parallel dazu wurden die B-LCL mit HPV 16 E6 oder HPV 16 E7 oder CMVpp65 beladen. In ELISpot-Assays wurde getestet, wie die isolierten CD8⁺ T-Zellen auf bestrahlte B-Zellen reagierten (Abb. 3.21 B - E). Es wurde parallel die Sekretion von IFN- γ (Abb. 3.21 B), IL-10 (Abb. 3.21 C), Granzym B (Abb. 3.21 D) und Perforin (Abb. 3.21 E) gemessen. Als Negativkontrolle dienten bestrahlte B-LCL, unstimulierte CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen stimuliert mit unbeladenen, bestrahlten B-LCL. Wie erwartet, zeigte eine nicht messbare Zahl an CD8⁺ T-Zellen der CMV-positiven Spender eine Reaktion auf CMVpp65 beladene B-LCL durch Sekretion von IFN- γ . Die Sekretion von IL-10, Granzym B und Perforin der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit CMVpp65 beladenen B-LCL lag dagegen nur unwesentlich bis nicht über den Kontrollwerten der CD8⁺ T-Zellen, die mit unbeladenen B-LCL stimuliert wurden. Die Reaktionen der CD8⁺ T-Zellen auf B-LCL, die mit HPV 16 E6 oder E7 beladen wurden, fielen ebenfalls erwartungsgemäß aus, es waren keine HPV 16-spezifischen Reaktionen messbar. Unerwartet hoch war die Reaktion der CD8⁺ T-Zellen auf unbeladene B-LCL. Diese lag in allen Testen deutlich über den Kontrollwerten der unstimulierten CD8⁺ T-Zellen, obwohl die B-LCL autolog generiert wurden. Damit war der Einsatz beladener EBV-transformierter B-LCL - trotz autologer Generierung - als *scaffold* Reagenz für ein optimales HPV 16-spezifisches Expansionsprotokoll nicht möglich.

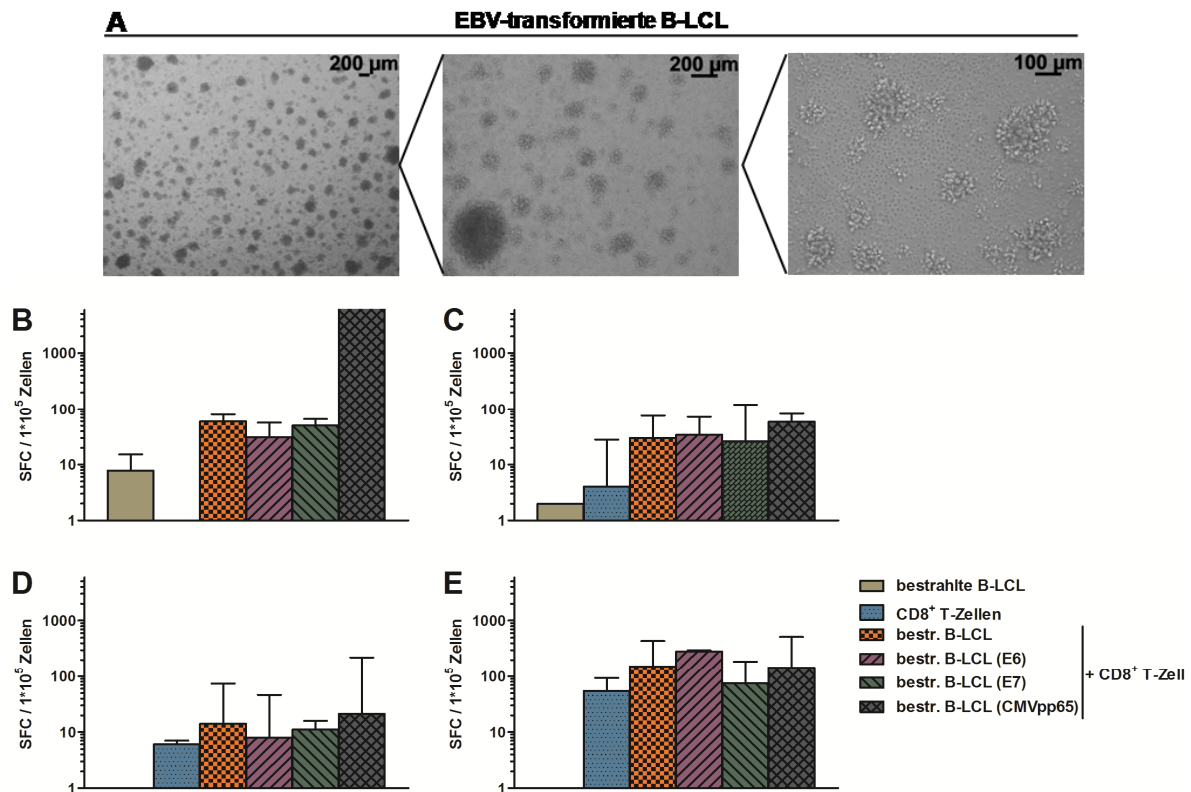


Abb. 3.21 EBV (Epstein-Barr-Virus)-transformierte B-LCL (B-Lymphoblastoid Cell Line) als professionelle Antigen-präsentierende Zellen. **A)** Mikroskopische Aufnahmen einer EBV-transformierten B-LCL in den Vergrößerungen 4x (links), 10x (Mitte) und 20x (rechts). Die Aufnahmen zeigen die EBV-transformierten B-LCL eines der drei Spender acht Wochen nach Transformation. Durchflusszytometrische Analysen der Zellen auf Lymphozyten-typische Marker zeigten, dass es sich um nahezu reine B-Zellkulturen handelte. **B - E)** ELISpot-Assays von CD8⁺ T-Zellen stimuliert mit den jeweiligen autologen B-LCL. Als Kontrolle dienten bestrahlte B-LCL, unstimulierte CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen stimuliert mit bestrahlten, unbeladenen B-LCL. Dazu wurde die Sekretion von IFN- γ (**B**), IL-10 (**C**), Granzym B (**D**) und Perforin (**E**) einer Kokultur von CD8⁺ T-Zellen und B-LCL, die mit HPV 16 E6, HPV 16 E7 oder CMVpp65 beladen waren, gemessen. Für einen besseren Vergleich zwischen den Zytokinen / zytotoxischen Proteinen wurde auf Spots pro 100.000 Zellen hochgerechnet [SFC (*Spot Forming Cells*) / $1 \cdot 10^5$ Zellen]. Dargestellt wurden die medianen Werte mit IQR (*Interquartile Ranges*). Die Reaktion der CD8⁺ T-Zellen der CMV-positiven Spender auf CMVpp65-beladene B-LCL war eindeutig positiv, die Menge an Zellen, die IFN- γ sezernierten, lag oberhalb der Nachweisgrenze und war aus diesem Grund nicht zählbar. Dagegen waren die Zahlen der Zellen, die IL-10, Granzym B oder Perforin sezernierten, nur unwesentlich höher als die Werte der Reaktionen von CD8⁺ T-Zellen auf unbeladene B-LCL. Die Ergebnisse der Reaktionen von CD8⁺ T-Zellen auf B-LCL, die mit HPV 16 E6 oder E7 beladen wurden, fielen wie erwartet größtenteils negativ aus, es waren kaum HPV 16-spezifische Reaktionen messbar. Unerwartet war die in allen Fällen insgesamt sehr hohe Zahl an CD8⁺ T-Zellen, die auf unbeladene B-LCL reagierten. Die Werte lagen deutlich über denen der unstimulierten CD8⁺ T-Zellen. Damit eigneten sich beladene EBV-transformierte B-LCL nicht für die Optimierung eines HPV 16-spezifischen Expansionsprotokolls.

4. Diskussion

4.1. Assay-Optimierung

Die gewählten Assays, ELISpot und EuTDA, haben den Vorteil der gleichzeitigen Analyse der Funktionsfähigkeit und Spezifität von Zellen. Mittels ELISpot-Assays können alle gewünschten sezernierten Zytokine und zytotoxischen Proteine auf Einzelzellniveau untersucht werden (Czerkinsky, Nilsson, Nygren, Ouchterlony, & Tarkowski, 1983; Czerkinsky, Andersson, Ekre, Nilsson, Klareskog, & Ouchterlony, 1988; Taguchi, et al., 1990), sofern die entsprechenden monoklonalen Detektionsantikörper verfügbar sind. Auf Grund der vielen verschiedenen Möglichkeiten der Versuchsdurchführung (Britten, et al., 2008; Janetzki, Hoos, Melief, Odunsi, Romero, & Britten, 2013; Lindemann, Böhmer, Zabel, & Grosse-Wilde, 2003; Malyguine, Strobl, Dunham, Shurin, & Sayers, 2012; Mander, et al., 2010; Nowacki, Bettenworth, Ross, Heidemann, Lehmann, & Lügering, 2012; Shafer-Weaver, et al., 2003) kann es notwendig sein, für eine bestimmte Fragestellung ein Protokoll zu optimieren. Dies kann allerdings Zeit-, Kosten- und Material-intensiv sein und stellt besonders bei schwach reaktiven Zellen eine langwierige Herausforderung dar. Nun konnte ich mit meiner Arbeit zeigen, dass die Reaktion von Lymphozyten gesunder Spender auf Stimulation mit HPV 16 E6 und HPV 16 E7 Peptidmischen äußerst schwach ist. Dennoch gelang die Optimierung von ELISpot-Assays zur Messung von IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin als Auswahl der Darstellung einer eher Th1-gerichteten Antwort (IFN- γ) im Vergleich zu einer herunter regulierenden Immunreaktion (IL-10) und einer zytotoxischen Antwort (Granzym B und Perforin). Da die detektierten Spots für die getesteten sezernierten Substanzen vom Aussehen her sehr unterschiedlich beschaffen sind, wurden die Assays hinsichtlich der Zellzahl bei sonst gleichbleibenden Protokoll optimiert, um eine parallele Messung der sezernierten Substanzen auf derselben ELISpot-Platte zu ermöglichen. Dies war besonders bei der Messung von Granzym B eine Herausforderung, da hierfür üblicherweise deutlich kürzere Protokolle verwendet werden als unseres (Nowacki, Bettenworth, Ross, Heidemann, Lehmann, & Lügering, 2012; Shafer-Weaver, et al., 2003). Die unterschiedlichen optimalen Zellzahlen machen den Vergleich der Zahlen zwischen den Substanzen schwierig, da die mathematische Berechnung der Spots auf eine gemeinsame Zellzahl unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs der Reaktionen steht. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, wäre den Optimierungsschwerpunkt auf die Dauer der Inkubation statt der Zellzahl zu richten und in Kinetik-Ansätzen für die jeweilige Substanz die optimale Dauer der Inkubation bei gleichbleibender Zellzahl zu bestimmen. Ich hatte mich für die Titration der Zellzahl entschieden, da ich die Tests parallel auf denselben 96-well Filterplatten ansetzen wollte, um mögliche Platten-abhängige Abweichungen zu vermeiden, und da sich in der Austestung der Vorinkubation zeigte, dass im Bereich der als optimal errechneten Zellzahlen von 25.000 bis 100.000 kein statistisch signifikanter Anstieg in den unstimulierten Negativkontrollen messbar war.

Neben den ELISpot-Assays habe ich den EuTDA-Assay als Test für die Ermittlung des zytotoxischen Potenzials von Lymphozyten und T-Zellen bei HPV 16-positiven oder -negativen Zielzellen erfolgreich optimiert. Auch wenn darüber berichtet wird, dass sich der Granzym B ELISpot-Assay als "Alternative für die Messung zellvermittelter Zytotoxizität" eignet (Shafer-Weaver, et al., 2003), ist ein Test, bei dem der spezifische Angriff auf Zielzellen durch die Zerstörung der Plasmamembran in Verbindung mit der Freisetzung einer Substanz, die spezifisch in die Zielzellen eingebracht wurde, nachgewiesen wird, meines Erachtens nach vorteilhafter für die umfassende Darstellung der Funktionsfähigkeit der Effektorzellen. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, wird als klassischer Test zum Nachweis des spezifischen Angriffs auf Zielzellen der ^{51}Cr -Release Assay (Dunkley, Miller, & Shortman, 1974), bei dem die Freisetzung von radioaktivem Chrom (^{51}Cr) nachgewiesen wird. Der große Nachteil dieses Testverfahrens ist die Radioaktivität, wodurch der Test aufwändig und teuer wird. Ein Test, der ohne Radioaktivität auskommt, ist der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-release-Assay (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2008). Hier wird die Eliminierung der Zielzellen biochemisch nachgewiesen. Allerdings wird von allen Zellen, deren Plasmamembran während der Experimente defekt werden, der Zellinhalt in das Kulturmedium entleert. Da LDH ubiquitär in allen Zellen vorkommt, kann somit nicht zwischen Ziel- und Effektorzellen unterschieden werden. Die Lösung dieser Nachteile liegt in einem Test, der sowohl nicht radioaktiv ist, als auch die Messung einer spezifisch in Zielzellen eingebrachten Substanz beinhaltet, die nach Zerstörung der Plasmamembran freigesetzt wird. Der EuTDA-Assay, ist ein solcher Test. Er basiert auf demselben Prinzip, wie der ^{51}Cr -Release Assay, es wird jedoch ein nicht radioaktiver, Fluoreszenz anregender Ligand, bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate (BATDA), statt ^{51}Cr eingesetzt. Dieser ist lipophil und kann somit in das Zellinnere gelangen. Hier wird der Ligand in seine hydrophile Form, 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diacarboxylate (TDA), umgesetzt und verbleibt somit im Zellinneren, solange die Plasmamembran intakt ist. Findet Zytolyse durch Effektorzellen, beispielsweise zytotoxische Lymphozyten, statt, wird das TDA freigesetzt und befindet sich nach einem Zentrifugationsschritt im Überstand. Wird der Überstand mit einer Europiumlösung zusammengebracht, entwickelt sich messbare Fluoreszenz. Bei der Optimierung wurde deutlich, dass sich adhärente Zielzellen ebenso gut einsetzen lassen wie Suspensionszellen. In beiden Fällen war in den Kontrollen eine ausreichend große Spanne zwischen der normierten Spontan- und der normierten Maximalfreisetzung messbar, in welcher die spezifische Freisetzung durch zellvermittelte Toxizität gemessen werden kann. Das einzige Problem, das bei der Optimierung des EuTDA Zytotoxizitätstests deutlich wurde, ist die abhängig von den gewählten Zielzellen relativ kurze Zeitspanne, in der die Ergebnisse verlässlich messbar sind. Bei einer hohen Zahl an aktivierten T-Zellen stellt dies allerdings kein Hindernis dar. Hierbei eignet sich wiederum ein Granzym B ELISpot-Assay zur Abschätzung der Zahl reaktiver Zellen sehr gut, sodass alle

optimierten Teste zusammen ein sehr gutes Bild der Funktionsfähigkeit und Spezifität der eingesetzten Zellen liefert. Natürlich ist es möglich, noch weitere Teste für die Untersuchung HPV 16-spezifischer Reaktionen von Lymphozyten zu etablieren, um ein noch detailreicheres Bild der Reaktionen zu erhalten. So würden sich beispielsweise neben der notwendigen phänotypischen Charakterisierung von Zellmarkern, wie es bei den Kooperationspartnern der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt wurde, Überstandmessungen von Zellkulturen mittels ELISA oder Cytokine Arrays anbieten, um neben der im ELISpot ermittelten Zahl reaktiver Zellen die Menge an sezernierten Zytokinen und zytotoxischen Proteinen zu bestimmen oder abzuschätzen, welche Proteine näherer Untersuchung bedürfen könnten. Dabei liegt der Vorteil der absoluten quantitativen Auswertungsmöglichkeit bei den ELISA-Assays, da hier für jeden Test Standardkurven mitgeführt werden (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), 2008). Diese Möglichkeit gibt es bei den Cytokine Arrays nicht, hier lässt sich lediglich die Signalintensität eines Zytokins auf der Membran feststellen (RayBiotech, Inc.). Der Vorteil der Cytokine Arrays ist, dass aus einer kleinen Probenmenge von nur 1 mL in einem parallelen Ansatz sehr viele Informationen gewonnen werden können. Da die Testung verschiedener Zytokine auf derselben Membran erfolgt, sind keine Inter-Assay Varianzen zu bedenken. Außerdem ist die Anzahl der parallel messbaren Proteine sehr hoch, beispielsweise bis zu 274 Proteine in Doppelbestimmung (RayBiotech, Inc.). Damit bieten sich Cytokine Arrays zum Abschätzen der Reaktionen an, welche Zytokine und zytotoxischen Proteine durch Stimulation reguliert werden. Mittels ELISA-Assays ließe sich anschließend quantitativ die Menge der sezernierten Proteine genau bestimmen. Eine weitere interessante Möglichkeit, HPV 16-spezifische Immunreaktionen zu untersuchen bietet die intrazelluläre Färbung von Zytokinen (ICS, *intracellular cytokine staining*) (Foster, Prussin, Liu, Whitmire, & Whitton, 2007; Lovelace & Maecker, 2011; Nomura, Maino, & Maecker, 2008). Der große Vorteil dieser sehr sensitiven Methode ist die parallele Analyse verschiedener Zytokine auf der Ebene von Einzelzellen (Foster, Prussin, Liu, Whitmire, & Whitton, 2007). Außerdem ist nicht nur die Darstellung der Zytokinproduktion nach erfolgtem Stimulus möglich, gleichzeitig können in einem multiparametrischem Ansatz auch phänotypische Biomarker untersucht werden und so die Produktion der gemessenen Zytokine direkt den verschiedenen Populationen der Immunzellen zugeordnet werden (Lovelace & Maecker, 2011). ICS basiert auf denselben Prinzipien, wie anderweitige durchflusszytometrische Analysen, es werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper zur Markierung der gewünschten Proteine verwendet und die Zellen werden in einem Durchflusszytometer analysiert (Foster, Prussin, Liu, Whitmire, & Whitton, 2007; Lovelace & Maecker, 2011; Nomura, Maino, & Maecker, 2008). Da es sich im Gegensatz zur phänotypischen Analyse von Zellpopulationen allerdings um eine intrazelluläre Färbung handelt, müssen die stimulierten Zellen fixiert und permeabilisiert werden, um den

Antikörpern Zugang zu den Zielproteinen zu verschaffen (Foster, Prussin, Liu, Whitmire, & Whitton, 2007; Lovelace & Maecker, 2011; Nomura, Maino, & Maecker, 2008). Außerdem ist die Zugabe von Hemmstoffen erforderlich, die die Ausschüttung der produzierten Zytokine verhindert und so zu intrazellulärer Akkumulation führt (Foster, Prussin, Liu, Whitmire, & Whitton, 2007; Lovelace & Maecker, 2011; Nomura, Maino, & Maecker, 2008). Die erforderliche Zugabe solcher Zusatzstoffe ist in meinen Augen kritisch. Unterschiedliche Kinetiken in der Produktion und der Sekretion der verschiedenen Zytokine und zytotoxischen Proteine machen die Bestimmung eines optimalen Messzeitpunktes sehr schwierig. Außerdem sind die Stoffe, die üblicherweise zur Fixierung, Akkumulation und Permeabilisierung verwendet werden über einen längeren Zeitraum hinweg zytotoxisch, was zu anspruchsvollen technischen und analytischen Herausforderungen führt. Für die Größe der Plattform zur Charakterisierung HPV 16-spezifischer Reaktionen sind jedoch mehrere Faktoren ausschlaggebend: neben der Sensitivität der Methoden und der verschiedenen Vor- und Nachteilen sind vor allem die Menge der zur Verfügung stehenden Zellen und die Stärke der Reaktionen limitierend. Nicht zuletzt dadurch, dass sich in den Experimenten zur Optimierung der ELISpot-Assays bereits abzeichnete, dass HPV 16-spezifische Reaktionen von Lymphozyten gesunder Probanden nur mäßig stark ausfallen, wurde auf die Erweiterung der Plattform verzichtet. Auch sollte im Hinblick auf eine zellbasierte Immuntherapie nur eine möglichst geringe Zahl an Zellen für die Testung der Funktion und Spezifität gegen HPV 16 verwendet werden, um möglichst viele Zellen für den Transfer in den Patienten zur Verfügung zu haben.

4.2. Untersuchung von Zellen gesunder Probanden auf HPV-Spezifität

Um ein Kollektiv zu finden, dass möglichst viele HPV-spezifische Zellen besitzt, wurden gesunde, HPV-geimpfte Probanden analysiert. Sollten sie eine größere Zahl HPV-reaktiver Lymphozyten haben, wären ihre Zellen besonders geeignet, um HPV-spezifische Zellen zu expandieren. In der Studie "Immunität gegenüber humanem Papillomavirus (HPV) bei geimpften und ungeimpften Probanden" wurden drei Probandengruppen verglichen: männlich, ungeimpft; weiblich, ungeimpft und weiblich, geimpft. Hintergrund hierfür ist die in Deutschland bestehende Impfempfehlung der Ständigen Impfkommission für weibliche Personen (Ständige Impfkommission am RKI, 2012). Die Messungen zeigten, dass die Immunantworten in allen Probandengruppen sehr individuell ausfielen, wobei ungeimpfte Personen zu einer eher höheren Produktion von IL-10 neigten, was für eine herunter regulierende Immunantwort spricht. Dabei könnte es sich um eine sogenannte *Escape* Reaktion handeln, mit der die Viren versuchen, der Beseitigung durch das Immunsystem zu entgehen und die Infektion festzusetzen, bzw. deren Voranschreiten zu begünstigen. Sollte sich eine solche Reaktion auch bei frisch isolierten Lymphozyten von Patienten mit HPV 16-positiven Kopf-Hals-Tumoren finden, spricht dies des Weiteren sogar für eine *Tumour*

Escape Reaktion, mit der sich infizierte und tumorös veränderte Körperzellen vor einer zytotoxischen Zellantwort schützen. Die Bestätigung einer solchen Hypothese bedarf allerdings weiterer genauer Untersuchungen. Das Sekretionsprofil der mit einem handelsüblichen HPV-Impfstoff geimpften Probandinnen fiel insgesamt günstiger aus als dasjenige der ungeimpften Probanden, wenngleich die Unterschiede lediglich bei der Sekretion von Perforin nach Stimulation mit HPV 16 E6 signifikant verschieden waren. Besonders die Sekretion der zytotoxischen Proteine, Granzym B und Perforin, war fast ausnahmslos höher und weist auf eine günstigere zytotoxische Immunantwort nach Impfung gegen HPV hin. Dies würde zwar keine erneute Infektion verhindern, jedoch könnten hiermit infizierte Körperzellen besser erkannt und beseitigt werden, wodurch das vorher aufgezeigte potentielle virale Selbstschutz durchbrochen werden kann. Ein Grund, warum die HPV 16-spezifische Reaktion der Lymphozyten geimpfter Probandinnen nicht höher ausgefallen ist, mag an der Zusammensetzung des Impfstoffs liegen. In der Gruppe waren alle Probandinnen mit dem Impfstoff Gardasil® geimpft, einem tetravalenten, rekombinanten Impfstoff gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 (National Cancer Institute, 2011; Sanofi Pasteur MSD, 2014). Der Hauptbestandteil des Impfstoffes ist das rekombinant in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellte L1-Protein (National Cancer Institute, 2011; Sanofi Pasteur MSD, 2014), ein Protein aus der Hülle des Virus. Aus diesem Grund sollten sich die Reaktionen der Probandengruppen bei Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 theoretisch nicht unterscheiden, da keines der beiden onkogenen Proteine im Impfstoff enthalten ist. Der sichtbare Unterschied zwischen der ungeimpften und geimpften Probandinnengruppe lässt sich jedoch auf nichts anderes als die Impfung zurückführen, da in beiden Gruppen gesunde Normalpersonen ungefähr gleichen Alters getestet wurden und sich in den ungeimpften Probandengruppen keine Korrelation zwischen dem Alter und der HPV 16-spezifischen Reaktion der Lymphozyten ergab. In der Gruppe der geimpften Probandinnen war die Altersspanne zu gering für eine Korrelationsanalyse, da die Impfung erst seit September 2006 in Deutschland zugelassen ist (Sanofi Pasteur MSD, 2014). Seit Zulassung und Empfehlung der Impfung durch die Ständigen Impfkommission wird die Impfung gegen HPV immer wieder kontrovers diskutiert, besonders im Hinblick auf die Frage, ob die Impfung Neuerkrankungen an HPV-bezogenen Krebsarten verhindert (Dören, et al., 2008; Huff, 2013; Miller, 2013; Rabe, 2015). Diese Frage konnte bisher ebenfalls auf Grund der kurzen Zeitspanne seit Impfbeginn noch nicht geklärt werden. Es liegen jedoch Studien vor, dass durch die Impfung die Häufigkeit von Präkanzerosen, die zu Gebärmutterhalskrebs führen, um bis zu 80% zurückgegangen ist (Hariri, et al., 2015; Smith & Canfell, 2014). Insgesamt nahmen die Inzidenzen für verschiedene HPV-bedingte Erkrankungen in geimpften Personen, untersucht in verschiedenen Studien weltweit über den Zeitraum seit Beginn der Impfungen, deutlich ab (Chow, et al., 2015; Harrison, et al., 2014; Smith & Canfell, 2014; Stanley, 2014). Dies spricht für den positiven Effekt der Impfung. Besonders deutlich wird

dies in Ländern, in denen die Impfeempfehlung für beide Geschlechter ausgesprochen sind oder Impfungen sogar obligatorisch flächendeckend eingeführt wurden (Rickert, Auslander, Cox, Rosenthal, Rupp, & Zimet, 2015). Vermutlich bedarf es in der breiten Bevölkerung genauerer medizinischer Aufklärung, da die pauschalisierte Aussage, der HPV-Impfstoff sei eine "Impfung gegen Krebs", in dieser Form nicht wahr ist und weder im Datenblatt des Impfstoff noch auf der Herstellerhomepage über Gardasil so formuliert wird (Merck Sharp & Dohme Corp, 2014; Sanofi Pasteur MSD, 2014). Es wird zwar eine Verbindung zwischen den HPV-Typen und HPV-bedingten Erkrankungen inklusive der Krebsarten hergestellt, allerdings wird auch klar geschrieben, dass die Impfung explizit gegen die HPV-Typen schützt (Merck Sharp & Dohme Corp, 2014). Damit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass ein Schutz vor Krankheiten bedingt durch einen der im Impfstoff enthaltenen HPV-Typen vorliegt, garantiert wird dies jedoch nicht. Im Datenblatt wird weiterhin klar darauf hingewiesen, dass der Impfstoff prophylaktisch wirkt und keinen Effekt auf bestehende Infektionen hat und keine therapeutische Wirkung nachgewiesen ist (Sanofi Pasteur MSD, 2014). Da neben der belegten Wirksamkeit des tetravalenten Impfstoffs bezüglich der humoralen Immunantwort in der von mir durchgeführten Studie zur Immunität gegenüber HPV auch ein im Vergleich zu ungeimpften Probanden günstigeres zelluläres Sekretionsprofil bei Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 belegt werden konnte, bin ich der Meinung, dass der HPV-Impfstoff besser ist, als sein Ruf, und auch in Deutschland eine Impfeempfehlung für beide Geschlechter sinnvoll wäre. Damit ließe sich eine Verbreitung von HPV-Infektionen zumindest für die im Impfstoff enthaltenen Typen verlangsamen, da das Immunsystem geimpfter Personen mit positiver Impfantwort in der Lage ist, dergleichen Infektionen schneller zu eliminieren und es so zu weniger persistierenden Infektionen und nachfolgenden tumorösen Veränderungen in befallenen Zellen kommt. Da die zelluläre HPV 16-spezifische Immunantwort unabhängig vom Status der Impfung jedoch insgesamt gering war, gewann die Erstellung eines Protokolls zur Expansion HPV 16-spezifischer Zellen für einen möglichen zellbasierten Therapieansatz bereits bestehender HPV 16-bedingter Tumore weiter an Bedeutung.

4.3. Expansion HPV 16-spezifischer MNZ

Für einen adoptiven Transfer von T-Zellen im Therapie-Maßstab sind mehrere Milliarden Zellen notwendig (Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008). Durch die geringe Zahl HPV 16 E6 und E7-reaktiver Zellen in gesunden Spendern ist ein sehr effektives Protokoll zur Expansion HPV 16-spezifischer Zellen besonders wichtig. Durch die geringe Ausgangszahl ist ein entsprechend längerer Expansionszeitraum notwendig (Zentz, et al., 2007), um auf die nötige Zellzahl zu kommen, als in anderen Ansätzen mit hohen Zahlen spezifisch reagierender Zellen (Schreurs, Scholten, Kueter, Ruizendaal, Meijer, & Hooijberg, 2003). Gerade die geringe Ausgangszahl stellte uns zu Beginn allerdings vor das Problem,

dass nur wenige Bedingungen zur Optimierung eines GMP-konformen Protokolls parallel analysiert werden konnten. Dabei sind die Möglichkeiten, Immunzellen *ex vivo* für einen immuntherapeutischen Ansatz zu bearbeiten, beinahe unbegrenzt. Vieles hängt davon ab, welchen Zelltyp man bearbeiten möchte, da jeder seine eigenen Anforderungen hat. Ich möchte mich hier auf die Möglichkeiten der Bearbeitung von T-Zellen beschränken, da diese von Bedeutung für die vorliegende Arbeit waren. Ein wichtiger Schritt ist die Entscheidung, welche Population an T-Zellen bearbeitet werden soll. Es lässt sich die gesamte T-Zellpopulation verwenden (Ramos, et al., 2013; Zentz, et al., 2007), ebenso nur eine bestimmte Gruppe isolieren (Chiu, Schneck, & Oelke, 2011; Schreurs, Scholten, Kueter, Ruizendaal, Meijer, & Hooijberg, 2003; Trivedi, Williams, O'Reilly, & Koehne, 2005) oder ausschließen (van Leeuwen, Gamadia, Baars, Remmerswaal, ten Berge, & van Lier, 2002; Wöfl, et al., 2011). Möchte man ein Milieu schaffen, das möglichst nah an der natürlichen Zusammensetzung der Population ist, sollten natürlich alle T-Zellen bearbeitet werden. Hierbei kann die Bearbeitung allerdings dazu führen, dass die gewünschte Reaktion einer T-Zellsubpopulation durch unerwünschte Reaktionen anderer T-Zellsubpopulationen gestört oder unterdrückt wird. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn T-Zellen eine Th2-gerichtete Immunantwort fördern würden, da hierdurch die zelluläre Immunantwort - vermittelt durch bestimmte T-Zellsubpopulationen - unterdrückt wird (Murphy, 2011). Soll ein zytotoxischer Effekt durch CD8⁺ Killer-T-Zellen erreicht werden, wirkt sich die Förderung regulatorischer T-Zellen, die supprimierende Zytokine sezernieren, ebenfalls negativ aus (Murphy, 2011). Beide Fälle lassen sich vermeiden, indem beispielsweise generell nur CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* isoliert und bearbeitet werden. Im Vergleich der Expansion aller T-Zellen im Gegensatz zur Expansion der reinen CD8⁺ T-Zellpopulation zeigte sich kein eindeutiger Vor- oder Nachteil einer der beiden Strategien im Falle einer HPV 16-spezifischen Expansion. Zwar war bei der gesamten T-Zellpopulation über den Zeitraum der Expansion hinweg keine herunter regulierende Immunreaktion zu beobachten, die Sekretion von IL-10 blieb auf einem konstanten Niveau. Jedoch wurde daneben weder die Th1-gerichtete noch die zytotoxische Immunantwort durch T-Helferzellen gefördert, die Sekretion von IFN- γ , Granzym B und Perforin stieg über den Expansionszeitraum nicht an und blieb sogar häufig unter dem Niveau der initialen Stimulation zurück.

Auf Grund der schwachen Reaktionen der Immunzellen auf HPV 16 E6 und E7 Peptidmische sollte ein bereits gut analysiertes, Virus-spezifisches Protokoll etabliert werden und als Modell dienen. CMV wurde als Modell gewählt, da zum einen Lymphozyten positiv getestet, gesunder Personen und somit auf Grund der hohen Frequenzen eine große Ausgangsmenge CMV-spezifischer Zellen verfügbar waren. Anhand der veröffentlichten Protokolle wurde zum anderen deutlich, dass eine CMV-spezifische Expansion unter verschiedenen Bedingungen gut zu etablieren ist und somit ein GMP-konformes Protokoll

unproblematisch sein sollte. Die Basis des GMP-konformen Protokolls sollte auf einer Kombination der Zytokine IL-7, IL-15 und IL-21 erfolgen. IL-7 ist bekannt für seine Rolle als T-Zell Wachstumsfaktor und anti-apoptotischer Faktor, der für den Fortbestand sowohl von naiven als auch Gedächtniszellen sorgt (Miltenyi Biotec, 2012). IL-15 stimuliert u.a. die Proliferation aktivierter T-Zellen, fördert die Generierung zytotoxischer T-Zellen und ist ebenfalls wichtig für die Erhaltung von Gedächtniszellen (Cornish, Sinclair, & Cantrell, 2006; Kanegane & Tosato, 1996; Miltenyi Biotec, 2012). IL-21 ist für eine ähnliche Rolle bekannt, es stimuliert u.a. die Proliferation von Lymphozyten und fördert zytotoxische T-Zellen (Miltenyi Biotec, 2012; Santegoets, et al., 2013; Sutherland, Joller, Michaud, Liu, Kuchroo, & Grusby, 2013), wobei auch von synergistischen Effekten von IL-15 und IL-21 berichtet wird (Zeng, et al., 2005). Aus diesen Gründen wurde ein Ausgangsprotokoll gewählt, dass diese drei Zytokine kombiniert einsetzt (Wölfl, et al., 2011) und erfolgreich von den Kooperationspartnern in der Forschungsabteilung HNO-Klinik des Universitätsklinikums Essen und bei Miltenyi für das Protokoll einer CMV-spezifischen Expansion CD137⁺ T-Zellen aus gesunden CMV-positiven Spendern, angereichert nach Stimulation mit einem CMVpp65 Peptidmix, adaptiert. Der Übertrag dieses Protokolls auf die Expansion CD137⁺ T-Zellen aus gesunden Spendern nach Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen gelang allerdings nicht, sodass das Protokoll optimiert und um die Zugabe von Proleukin[®] S, einem rekombinanten IL-2 Derivat (Novartis Pharma GmbH, 2014), erweitert. IL-2 - und auch das Derivat Proleukin[®] S - ist ebenfalls ein potenter Wachstumsfaktor für Lymphozyten und fördert die Proliferation und Differenzierung u.a. von T-Zellen (Miltenyi Biotec, 2012). Hierbei stellten wir - sowohl mein Kooperationspartner in der Forschungsabteilung HNO-Klinik als auch ich - jedoch fest, dass sich die CMV-spezifische Expansion mit dem optimierten Protokoll massiv von der HPV 16-spezifischen Expansion unterschied. Ein Überprüfen der Funktion und der Spezifität expandierter Zellen in optimierten ELISpot-Assays führte zu der Erkenntnis, dass sich die CMV-spezifische Expansion gerade auf Grund der hypothetischen Vorteile (definitiv positiv getestete Personen bei hoher Durchseuchung und gute Möglichkeiten schneller CMV-spezifischer Expansion) nicht als Modell für die Entwicklung eines HPV 16-spezifischen Expansionsprotokolls eignet. Der Versuch, CD137⁺ T-Zellen, angereichert nach Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen, lediglich mit Hilfe der zugesetzten Zytokine Proleukin, IL-7, IL-15 und IL-21 zu expandieren, scheiterte. Weder ließen sich HPV 16-spezifischen T-Zellen erhalten noch proliferierten die Zellen nach der ersten Woche Expansion. Hierin unterscheidet sich die Expansion niedrigfrequenter Zellen von der hochfrequenter Zellen deutlich. Bei niedrigfrequenten Reaktionen, wie es bei HPV 16 der Fall ist, kommt man nicht umhin, zusätzliche *scaffold* Reagenzien einzusetzen mit deren Hilfe die benötigten kostimulatorischen Signale dargestellt werden können. Die Präsentation der kostimulatorischen Signale kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Die klassische Methode ist die Präsentation der Signale durch autologe APC. Typischerweise werden für

derartige Ansätze dendritische Zellen aus Monozyten gewonnen und mit den gewünschten Antigenen beladen, wodurch die *in vivo* Situation nachgestellt wird, in der das Antigen im MHC-Komplex zusammen mit dem kostimulatorischen Signal den T-Zellen präsentiert wird (Murphy, 2011). Nachteil dieser Methode ist, dass die dendritische Zellen für jede Stimulation neu herangezogen werden müssen (Ramos, et al., 2013). Dies erfordert immer wieder Blutentnahmen, da sich nach meinen Erfahrungen Monozyten nur schlecht kryokonservieren lassen. Dies kann bei der Verwendung von autologem Material zu Schwierigkeiten führen, besonders bei Patienten mit - sei es durch die Krankheit oder angewandte Therapien - geschwächtem Immunsystem. Des Weiteren bedeutet es einen großen Aufwand und hohe Kosten, neben der eigentlichen Kultur der T-Zellen noch andere Zellen zu kultivieren. Auch Planungsgeschick ist notwendig, denn die APC müssen in ausreichender Menge punktgenau dann einsetzbar sein, wenn die T-Zellkultur es verlangt. Für die Zulassung zellbasierter Therapien ist es außerdem unerlässlich, aus Gründen der Arzneimittelsicherheit regulatorische Richtlinien einzuhalten (BfArM, 2014; Paul-Ehrlich-Institut, 2012). Das bedeutet, dass nicht nur die T-Zellkultur den Qualitätsstandards genügen muss, sondern auch jegliche weitere verwendete Zellkultur. Damit müssen beispielsweise alle verwendeten Zellen nach GMP (*Good Manufacturing Practice*) Richtlinien bearbeitet werden. GMP-konforme Materialien sind allerdings sehr kostenintensiv, wodurch die Menge verwendeter Materialien verständlicherweise möglichst gering gehalten werden sollte. Des Weiteren sind die Standardprotokolle für die Generierung der APC nicht in allen Punkten GMP-konform umsetzbar. Da die Umsetzung eines solchen Protokolls zu kostenintensiv und aufwändig für die Umsetzung in eine tatsächliche Therapie wäre, fiel die Wahl für ein mögliches *scaffold* Reagenz auf artifizielle APC. Hierfür wurden Mikropartikel mit CD3- und CD28-Antikörpern beschichtet. Über den CD3-Antikörper sollte die Anheftung an die T-Zellen erfolgen, bevor das eigentliche kostimulatorische Signal durch den CD28-Antikörper ausgelöst wurde. In einem solchen Ansatz ist zu beachten, dass die Partikel nicht wie natürliche APC in der Lage sind, die Peptide zu prozessieren und die benötigten Antigene zu präsentieren. Die spezifische Stimulation durch die Antigene muss entsprechend anderweitig gelöst werden, in meinem Fall durch Zugabe der Antigene als Peptidmix. Durch den Zusatz der "Beads" zu CD137⁺ T-Zellen, weiterhin angereichert nach Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen, ließ sich eine Expansion der Zellen erreichen, jedoch war in expandierten Zellen keine HPV 16-spezifische Reaktion in den Funktions- und Spezifitätsanalysen messbar. Auch eine Optimierung der Ratio "Beads" zu Zellen, dem Entfernen der "Beads" für Funktionsanalysen und die Änderung der Konzentration von IL-15 und IL-21 führten nicht zur gewünschten Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Entfernen der "Beads" aus den Kulturen letztendlich zum Verlust HPV 16-spezifischer Zellen führt, wurde ein anderes *scaffold* Reagenz getestet, das nach demselben Prinzip mit CD3- und CD28-Antikörpern beschichtet ist, auf Grund seiner

Beschaffenheit als Nanomatrix allerdings durch schlichte Zentrifugation aus der Kultur entfernt werden kann: TransAct Reagent. Trotz einiger Änderungen des Expansionsprotokolls zeigte sich sowohl für den Einsatz von "Beads" als auch für TransAct Reagent ein wiederkehrendes Bild: Es war nicht möglich, in expandierten T-Zellen HPV 16-spezifische Reaktionen zu messen. Ich möchte an dieser Stelle auf folgendes hinweisen: Nach Meinung der Arbeitsgruppe des Herstellers Miltenyi Biotec, die das TransAct Reagent entwickelt und zur Verfügung gestellt hat, waren die von mir gewählten experimentellen Bedingungen für die Verwendung der "Beads" und des TransAct Reagents nicht optimal. Demnach konnte auf Grund des gewählten Zeitpunkts für den Zusatz der *scaffold* Reagenzien nach Stimulation und Anreicherung der Zellen keine optimale Stimulation durch die Reagenzien erfolgen. Außerdem kann der erneute Zusatz der HPV 16 E6 und E7 Peptidmixe während der Expansionsphase zu einer Überreaktion und damit verbundenem Zelltod führen. Letzterer Überlegung stimme ich zu, da sich hierdurch die geringeren Zellzahlen in den Expansionskulturen mit vs. ohne Zusatz von Peptidmischen während der Expansionsphase, erklären lassen. Ob ein anderer Zeitpunkt für den Zusatz der *scaffold* Reagenzien tatsächlich zu einem besseren Ergebnis führt, muss experimentell bestimmt werden. Ein mögliches Protokoll für diese Testung wäre die Stimulation von angereicherten T-Zellen mit den Peptidmischen in Gegenwart der "Beads" oder des TransAct Reagent, gefolgt von einer oder mehreren Expansionsrunden nach dem bisherigen Protokoll. Hierbei müsste verglichen werden, ob eine gemeinsame Gabe der löslichen Peptidmixe und "Beads" bzw. des TransAct Reagents ausreichend ist oder ob sich die T-Zellen besser stimulieren lassen, wenn die Peptidmixe zusammen mit den CD3- und CD28-Antikörpern an die MACSiBead Particles oder das TransAct Reagent gebunden werden. Im Falle der Verwendung der MACSiBead Particles müssten die Peptidmixe hierfür biotinyliert werden, um eine Beschichtung wie mit den Antikörpern durchzuführen. Ob derart expandierte Zellen in Funktionsanalysen eine messbare HPV 16-Spezifität aufweisen ist allerdings schwer abzuschätzen. Möglicherweise kommt es auch bei früherem Zusatz der *scaffold* Reagenzien zu unspezifischer Expansion von T-Zellen, wie es bei dem von mir gewählten Zeitpunkt der Fall war. Ich habe die *scaffold* Reagenzien erst nach Anreicherung der T-Zellen zugegeben, um bei der initialen Stimulation nur Reaktionen auf den jeweiligen zugesetzten Peptidmix zu erhalten, der laut Herstellerangaben für eine effiziente *in vitro* Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen entwickelt wurde (Miltenyi Biotec) und deshalb theoretisch keine weiteren *scaffold* Reagenzien zur optimalen Aktivierung benötigen sollte.

Bei der Erstellung der optimalen *ex vivo* Bearbeitungsmethode für einen adoptiven T-Zelltransfer ist das Ziel, funktional aktive T-Zellen in einem ausreichend großen Maßstab zu erzeugen, sodass die Zellen dem Patienten zur Behandlung verabreicht werden können. Da es in meinen Händen innerhalb der begrenzten Projektzeit nicht möglich war, ein GMP

umsetzbares Protokoll zur Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen mit Hilfe der getesteten artifiziellen Mittel zu etablieren, wandte ich mich zuletzt dem erfolgversprechenderen Einsatz autologer APC zu. Neben dendritischen Zellen können auch aktivierte B-Zellen kostimulatorische Signale an T-Zellen übermitteln, weswegen sie zur Stimulation und Expansion von T-Zellen verwendet werden (Ramos, et al., 2013; Zentz, et al., 2007). Der Vorteil aktivierter B-Zellen ist, dass sie unter günstigen Bedingungen dauerhaft proliferieren (Tosato & Cohen, 2007). Wie bereits beschrieben, setzen Standardprotokolle zur Aktivierung von B-Zellen entweder EBV-haltige Überstände ein, wodurch B-LCL entstehen (Frisan, Levitsky, & Masucci, 2001; Schreurs, Scholten, Kueter, Ruizendaal, Meijer, & Hooijberg, 2003; Sun, et al., 1999; Tosato & Cohen, 2007; Yates, Warren, & Sugden, 1985) oder sie verwenden mit humanem CD40-Ligand transduzierte Mausfibroblasten (Ahmadi, Flies, Efebera, & Sherr, 2008; Ramos, et al., 2013; Zentz, et al., 2007). Um eine weitere zusätzliche Zellkultur zu vermeiden, fiel die Wahl auf die Verwendung des EBV-haltigen Überstands, da dieser gut in größerem Maßstab auf Vorrat produziert werden konnte. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Verwendung EBV-transformierter B-LCL sich nicht für eine Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen eignete, da die T-Zellen bereits stark auf unbeladene EBV-transformierte B-LCL reagierten. Dies ist dem Transformationsvorgang geschuldet, bei dem eine latente Infektion mit einer gewissen Zahl viraler Proteine erfolgt (Frisan, Levitsky, & Masucci, 2001; Yates, Warren, & Sugden, 1985). Dies führt zwar zur gewünschten Entstehung und Proliferation von B-LCL, jedoch können EBV-spezifische T-Zellen auf die viralen Proteine reagieren, wie anhand der von mir durchgeführten Experimente deutlich sichtbar wird. Der Vorteil des möglichen Einsatzes aktivierter B-Zellen als APC ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, besonders da der Einsatz solcher Zellen zur Expansion HPV 16-spezifischer Zellen bereits erfolgreich eingesetzt wurde (Ramos, et al., 2013; Zentz, et al., 2007). Die Herausforderung, die sich hier stellt, ist die GMP-konforme Generierung aktivierter B-Zellen. Dies sollte in naher Zukunft möglich sein, da neben den gängigen Methoden zur Generierung aktivierter B-Zellen die Möglichkeit besteht, lösliches CD40L einzusetzen (Khanna, et al., 2011; Lane, Bocker, Hubele, Padovan, Lanzavecchia, & McConnell, 1993; Wu, et al., 2010). Humanes CD40L ist als rekombinanter, aufgereinigter Antikörper seit einigen Monaten in GMP-konformer Qualität erhältlich (Miltenyi Biotec), sodass der experimentellen Aktivierung von B-Zellen und der Verwendung derart aktivierter B-Zellen für die Entwicklung eines immuntherapeutischen Ansatzes nichts im Wege steht. Natürlich sollte die Verwendung des Antikörpers mit den herkömmlichen Methoden zur Generierung aktivierter B-Zellen verglichen werden. Stellt sich löslicher CD40L dabei als ebenso leistungsstark wie auf Zellen exprimiertes CD40L heraus, steht einer GMP-konformen Generierung aktivierter B-Zellen nichts im Weg, da der Antikörper mittlerweile in einer Reinheit erhältlich ist, die GMP-tauglich und relevant für vorklinische Studien ist (Miltenyi Biotec). Neben dem Einsatz GMP-konformer autologer APC bleibt für

ein erfolgreiches Protokoll zur Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen zu klären, welches die optimale Ausgangspopulation ist. Hier muss zukünftig verglichen werden, ob es möglich ist, aktivierte T-Zellen nach Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen in ausreichend großer Zahl aufzureinigen und um welche T-Zellen es sich dabei handelt. Indes sollte analysiert werden, welcher Marker für die Anreicherung aktivierter T-Zellen die günstigste Wahl darstellt, da auf aktivierten T-Zellen die Expression sehr viele Marker hochreguliert wird, aber nur wenige Marker exklusiv auf T-Zellen vorkommen (Affymetrix eBioScience; Watanabe, et al., 2008). Die Wahl der anzureichernden Population ist dabei stark von der gewünschten Art der zu expandierenden Zellen abhängig, je nachdem, ob eher Effektor- oder Gedächtniszellen gewünscht sind, denn jede Subpopulation an T-Zellen - selbst innerhalb der CD8+ T-Zellen - exprimiert andere Marker (Affymetrix eBioScience; Erbo Christensen, Örding Andreasen, Pravsgaard Christensen, & Randrup Thomsen, 2001; Slifka & Whitton, 2000). Da die Zahl an Zellen, die ex vivo auf die Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen reagieren, in Lymphozyten gesunder Personen sehr gering ist, wird sich u. U. kein Marker finden, der zu einer ausreichend großen Ausgangspopulation führt. Hier bleibt die Möglichkeit, zunächst naive T-Zellen anzureichern, auf HPV 16 E6 und E7 zu *primen* und anschließend entsprechend optimale Bedingungen zur Expansion der angeregten Zellen zu finden, wie es bereits für Zellen anderer Spezifität erfolgte (Wölfl, et al., 2011). Neben der Möglichkeit, ein Protokoll zur Expansion HPV 16-spezifischer peripherer Lymphozyten zu etablieren, birgt eine Therapiemöglichkeit, bei dem Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) verwendet werden, meiner Meinung nach den vielversprechendsten Ansatz. Hierbei werden Lymphozyten aus operativ entfernten Tumorstücken isoliert, expandiert und entsprechend autolog wieder in den Patienten transferiert (Aetna Inc., 2014; Besser, et al., 2010; Goedegebuure, et al., 1995; The Ella Institute; Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008). Vorteil bei diesem Ansatz ist die Generierung autologer Zellen aus Patienten, die höchst Tumor-spezifisch sind, sofern TILs vorhanden sind. Problematisch im Falle von Kopf-Hals-Tumoren könnte wiederum die Zahl an isolierbaren TILs sein, da die Tumore - im Vergleich zu anderen soliden Tumoren - eher klein sind. Außerdem ist je nach Sitz des Tumors nicht immer ein operatives Entfernen des Tumors angeraten, beispielsweise auf Grund zu großer Nähe zur Wirbelsäule. Eine weitere Ansatz zur Etablierung einer Immuntherapie für Kopf-Hals-Tumore stellt die T-Zellrezeptor (TCR, *T cell receptor*) Gentherapie dar. Diese Art Therapie ist allerdings äußerst komplex. Prinzipiell müssen entsprechende Antigen-spezifische T-Zellrezeptoren eruiert und analysiert werden, bevor diese isoliert, kloniert und - mit oder ohne weiteren Modifikationen - mittels Gentransfer in Empfänger-T-Zellen eingebracht werden (Morris, Hart, Gao, Tsallios, Xue, & Stauss, 2006; Schmitt, Ragnarsson, & Greenberg, 2009; Uttenthal, Chua, Morris, & Stauss, 2012). Jeder einzelne der Schritte birgt - obwohl auf diesem Feld bereits viele Fortschritte gemacht wurden - anspruchsvolle technische Herausforderungen, bis die gewünschten funktionalen

modifizierten T-Zellen vorliegen (Schmitt, Ragnarsson, & Greenberg, 2009; Uttenthal, Chua, Morris, & Stauss, 2012). Trotz heikler Punkte gibt es vielversprechende Ansätze zur Behandlung HPV 16-positiver Tumore mittels TCR Gentherapie (Scholten, et al., 2005; Scholten, et al., 2006; Schreurs, Kueter, Scholten, Lemonnier, Meijer, & Hooijberg, 2005). Seit Oktober 2014 gibt es außerdem eine zugelassene Studie in den USA, bei der eine gegen HPV 16 E6 gerichtete TCR Immuntherapie zur Behandlung HPV-assoziiierter Tumore analysiert werden soll (Hinrichs, C. S.; National Cancer Institute, 2015). Erfreulicherweise werden in dieser Studie verschiedene HPV 16-assoziierte Tumore berücksichtigt, von Zervix- und Vaginalkarzinomen über Anal- und Peniskarzinome bis hin zu oropharyngealen Tumoren. Es wird jedoch noch einige Jahre dauern, bis eine derartige Therapie erfolgreich in Patienten eingesetzt werden kann. Die oben genannte Studie hat als primären Untersuchungsendpunkt das Jahr 2019 geplant. Aus diesem Grund bleibt die Forschungsarbeit zur Entwicklung eines GMP-konformen Protokolls HPV 16-spezifischer Lymphozyten äußerst wichtig und sollte unter Berücksichtigung der auf der vorigen Seite genannten Punkte weiter vorangebracht werden.

5. Zusammenfassung

Die erfolgreiche Behandlung von Tumoren ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Die Nebenwirkungen der etablierten Behandlungsmethoden Radio- und Chemotherapie sind für die Patienten häufig eine große Belastung. Bei soliden Tumoren, wie den Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*), bleibt noch die operative Entfernung, bei der allerdings einzelne Tumorzellen im Körper zurückbleiben können. Hier besteht die dringende Notwendigkeit, zielgerichtete Therapien zu entwickeln, da die HNSCC seit einigen Jahren die sechst häufigste Krebserkrankung darstellen und die Überlebensraten seit 15 Jahren stagnieren.

Im Fall der HNSCC bietet sich eine gute Möglichkeit für zielgerichtete Therapien, da ein Teil der HNSCC viral durch humane Papillomaviren (HPV) verursacht wird. Im Zuge der Infektion durch HPV werden die Onkogene E6 und E7 in das humane Genom der Wirtszellen integriert, sodass sich bei Patienten mit HPV-positiven HNSCC ein exklusiv auf den Tumorzellen vorkommender Marker finden lässt. Der vorherrschende HPV Typ in HPV-positiven HNSCC ist der Hochrisiko-Typ 16. Damit ist die Entwicklung einer zellulären Immuntherapie basierend auf HPV 16 E6 und E7-spezifischen T-Zellen naheliegend. Der kritische Schritt hierfür ist die *ex vivo* Expansion der Zellen, die bisher noch nicht unter GMP-konformen Bedingungen gelungen ist. Dies zu ändern war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit. Auf Grund von limitiertem Material von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wurden die Experimente der vorliegenden Arbeit mit mononukleären Zellen aus peripherem Blut gesunder Spender durchgeführt.

Um die Spezifität und Funktionalität der Immunzellen *ex vivo* und nach Expansion zu vergleichen, wurde zunächst eine Plattform zur Untersuchung HPV 16-spezifischer Reaktionen etabliert. Hierfür habe ich ein ELISpot-Protokoll für die Detektion von IFN- γ , IL-10, Granzym B und Perforin, sowie den Zytotoxizitätstest DELFIA® EuTDA zur Messung T-Zellvermittelter Toxizität optimiert. In den ELISpot-Assays zeigte sich, dass HPV 16-spezifische Reaktionen der Immunzellen gesunder Spender ohne HPV-Impfung sehr schwach waren (Frequenz der normierten medianen Spotzahlen nach Stimulation mit HPV 16 E6, bzw. E7, Frauen und Männer zusammengefasst: IFN- γ - 0,002 %, 0,0 %; IL-10 - 0,2 %, 0,07 %; Granzym B - 0,001 %, 0,004 %; Perforin - 0,001 %, 0,0 %). Wir stellten uns die Frage, ob bei gesunden Personen, die gegen HPV geimpft sind, mehr HPV 16-spezifische Zellen zu finden sind als bei ungeimpften Personen. Im Rahmen der Studie "Immunität gegenüber humanem Papillomavirus (HPV) bei geimpften und ungeimpften Probanden" konnte gezeigt werden, dass die Immunantworten sowohl bei ungeimpften als auch bei geimpften Probandinnen und Probanden sehr individuelle Ergebnisse ergaben. Interessanterweise fiel das Sekretionsprofil der geimpften Probandinnen ebenfalls schwach, wenngleich insgesamt günstiger aus. Besonders zeigten sie eine höhere Frequenz von Zellen, die HPV 16-spezifische Granzym B und Perforin sezernierten (IFN- γ - 0,002 %, 0,002 %; IL-10 - 0,02 %, 0,004 %; Granzym B -

0,004 %, 0,005 %; Perforin - 0,01 %, 0,009 %). Die geringe Frequenz erschwerte die Testung verschiedener Kulturbedingungen und -zusätze zur Entwicklung eines Expansionsprotokolls für HPV 16-spezifische T-Zellen. Ein CMV-spezifisches Protokoll für eine HPV 16-spezifische Expansion zu übernehmen war hierbei nicht einfach möglich, da sich die Reaktionen CMVpp65-spezifischer Zellen in den Funktionstestungen während des Expansionszeitraums deutlich von denen HPV 16 E6 und E7-spezifischer Zellen unterschieden. Somit blieb nur die Möglichkeit, verschiedene Bedingungen direkt mit HPV 16-spezifischen Zellen zu testen.

Publikationen der letzten Jahre weisen darauf hin, dass der Einsatz autologer, aktivierter B-Zellen zur erfolgreichen Expansion HPV 16-spezifischer Zellen beitragen kann. Standardprotokolle zur Aktivierung von B-Zellen sehen die Verwendung entweder von CD40L-transduzierter Mausfibroblasten oder von EBV (Epstein Barr-Virus)-haltigem Überstand der Zell-Linie B95.8 vor. Für die erfolgreiche Entwicklung eines Therapieansatzes ist es jedoch nötig, aktivierte B-Zellen unter GMP-Bedingungen herzustellen. Dies mag in naher Zukunft unter Einsatz von löslichem, entsprechend GMP-konform produziertem CD40L möglich sein. Die Verwendung EBV-transformierter B-LCL eignete sich in meinen Händen nicht für eine Expansion HPV 16-spezifischer T-Zellen. ELISpot Assays zeigten, dass T-Zellen bereits auf die unbeladenen EBV-transformierten B-LCL reagierten, da die Transformation der B-Zellen durch latente Infektion mit EBV-Proteinen erfolgte.

Die getesteten GMP-konformen Kulturbedingungen umfassten die Expansion von CD3⁺CD137⁺ T-Zellen vs. CD8⁺CD137⁺ T-Zellen nach Ko-Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen ohne weitere *scaffold* Reagenzien. Hier erfolgte keine Expansion der T-Zellen über den Expansionszeitraum hinweg. Ein Einsatz von CD3- und CD28-Antikörper beschichteten MACSiBead Particles ("Beads") als artifizielle APC führte zur Bildung großer Zellklone und 10-fachem (CD3⁺CD137⁺ T-Zellen), bzw. 38-fachem (CD8⁺CD137⁺ T-Zellen) Anstieg der Zellzahlen, jedoch ließ sich keine Spezifität für HPV 16 in den expandierten Zellen nachweisen. Ein Test verschiedener Verhältnisse von "Beads" zu Zellen bei Kulturen von CD8⁺CD137⁺ T-Zellen nach Ko-Stimulation mit HPV 16 E6 und E7 Peptidmischen mit und ohne Entfernung der "Beads" für die Funktionstestungen bestätigte die mögliche Expansion der T-Zellen (bis zu 13-fach) ohne Erhalt der Spezifität für HPV 16 E6 und E7. Außerdem wurde die Expansion von CD8⁺ T-Zellen nach Einzelstimulation mit HPV 16 E6 oder E7 Peptidmischen mit "Beads" vs. CD3- und CD28-gekoppeltem TransAct Reagent in verschiedenen Konzentrationen als *scaffold* Reagenzien getestet. Der Zusatz an "Beads" führte hierbei erneut zur Bildung großer Zellklone und bis zu 3,5-fachem Anstieg der Zellzahlen. Die gebildeten Zellklone waren bei Zusatz von TransAct Reagent deutlich kleiner und ebenfalls nicht HPV 16-spezifisch. Somit war es mir im Rahmen der begrenzten Projektzeit leider nicht möglich, optimale Bedingungen für ein GMP-konformes Expansionsprotokoll für HPV 16-spezifische T-Zellen mit Hilfe artifizieller APC zu etablieren.

Summary

One of the major challenges in modern medicine is the successful treatment of tumours. Side effects of radiotherapy and chemotherapy are often stressful for patients. Solid tumours like HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) can also be removed by surgery. However, it is questionable whether some tumour cells remain in the body. Therefore there is still the urgent need to develop therapeutic options that are target-orientated. Due to the fact, that HNSCC became the sixth most common cancer worldwide during the last years while surviving rates did not improve the last 15 years, it is especially important for patients bearing HNSCC to develop new therapy options.

In case of HNSCC such an opportunity might be provided as a part of the HNSCC is caused by human Papilloma viruses (HPV). A part of the viral genome - including the oncogenes E6 and E7 - is getting integrated into the human genome of the host cell during infection. Hence, on tumour cells of HPV-positive HNSCC a unique marker can be found. The main HPV type to be found in HPV-positive HNSCC is HPV 16. Thus the development of a cellular immunotherapy based on HPV 16 E6 and E7-specific T cells would be appropriate. The critical step for this therapeutic approach is the *ex vivo* expansion of the cells, which could not be managed under GMP-conditions yet. To change this situation was the main issue of this doctoral thesis. The experiments of my thesis had to be performed with peripheral blood mononuclear cells from healthy donors due to limited material from patients with HNSCC.

In the first instance it was important to establish a platform to analyse the HPV 16-specific reaction of immune cells in order to compare the specificity and functionality of the cells *ex vivo* and after expansion. I optimised a protocol for ELISpot assays to detect the secretion of IFN- γ , IL-10, Granzyme B and Perforin after stimulation with HPV 16 E6 and E7 peptide mixes. Furthermore I established and optimised the DELFIA® EuTDA test to measure T cell-mediated toxicity. With the ELISpot assays it turned out that the HPV 16-specific reaction of immune cells from healthy donors without HPV vaccination was very weak (frequencies of standardised median spot values after stimulation with HPV 16 E6 or E7; men and women combined: IFN- γ - 0.002 %, 0.0 %; IL-10 - 0.2 %, 0.07 %; Granzyme B - 0.001 %; 0.004 %; Perforin - 0.001 %, 0.0 %). The question arose if the HPV 16-specific immunity in healthy, HPV vaccinated persons increased as compared to non-vaccinated ones. Within the study "Immunity against human Papilloma virus (HPV) in vaccinated and non-vaccinated probands" it was visible that the immune response greatly varied, both in non-vaccinated and vaccinated volunteers. Nevertheless, the secretion profile of vaccinated volunteers turned out to be similarly low, but overall more favourable (IFN- γ - 0.002 %, 0.002 %; IL-10 - 0.02 %, 0.004 %; Granzym B - 0.004 %, 0.005 %; Perforin - 0.01 %, 0.009 %). This could especially be seen in the secretion of Granzyme B and Perforin. This low frequency of HPV 16-specific cells made testing different culture conditions and scaffold supplements to develop an

optimal expansion protocol quite interminable. It was not possible to use a CMV-specific expansion model as the results of functional tests of CMVpp65-specific immune cells during the expansion period largely differed from the results of HPV 16-specific ones. Therefore the only possibility was to analyse different culture conditions with HPV 16-specific immune cells directly.

Publications of the recent years point out that it is possible to expand HPV 16-specific T cells using autologous, activated B cells. To develop a therapeutic approach using such T cells it would be necessary to activate B cells under GMP-conditions, though. Standard protocols to activate B cells use either CD40L-transduced mouse fibroblasts or supernatant from the cell-line B95.8 containing EBV (Epstein Barr-Virus), both being not GMP compliant. Using EBV-transformed B-LCL (B Lymphoblastoid Cell Lines) to expand HPV 16-specific T cells was not suitable in my hands. ELISpot assays showed, that T cells already reacted to unloaded EBV-transformed B-LCL due to the latent infection with EBV proteins during the transformation process. Nonetheless, it might be possible to activate B cells in a GMP compliant manner soon using soluble recombinant CD40L, which had been manufactured appropriately.

The GMP-compliant culture conditions I tested to develop a suitable expansion protocol were the following ones: Expansion of CD3⁺CD137⁺ T cells vs. CD8⁺CD137⁺ T cells after co-stimulation with HPV 16 E6 and E7 peptide mix without further scaffold reagents. In this case no expansion of T cells was measurable. Using MACSiBead particles labelled with CD3- and CD28-antibodies ("Beads") as artificial APC lead to generation of big cell clones and an increase in cell counts up to 10-fold (CD3⁺CD137⁺ T cells) and up to 38-fold (CD8⁺CD137⁺ T cells), respectively. Different ratios of "Beads" to cells in cultures of CD8⁺CD137⁺ T cells after co-stimulation with HPV 16 E6 and E7 peptide mixes with and without "Bead" removal for functional testing verified the possibility of expanding T cells (up to 13-fold) without preservation of the specificity against HPV 16 E6 and E7. Furthermore I tested the expansion of CD8⁺ T cells after stimulation with HPV 16 E6 or E7 peptide mix using "Beads" vs. CD3- and CD28-labelled TransAct Reagent in different concentrations as scaffold reagents. Addition of "Beads" again led to generation of big cell clones and up to 3.5-fold increase of cell counts. The generated cell clones after addition of TransAct Reagent were smaller and did also not show any HPV 16-specific reaction. Therefore, it was unfortunately not possible to find optimal conditions to expand HPV 16-specific T cells in a GMP compliant manner within this terminated project.

6. Anhang

Titration der Zellzahlen pro Kultur für die Detektion von IFN- γ , Granzym B, Perforin und IL-10 mittels ELISpot-Analyse

Für die Berechnung der Quotienten wurde bei einer medianen Zahl von 0 an gezählten Spots für die Negativkontrolle der Wert 0,1 eingesetzt.

Tab. 6.1 Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für IFN- γ

	Zellzahl pro Kultur	Mediane Spotzahl			Quotient	
		Negativ- kontrolle	HPV 16 E6	HPV 16 E7	HPV 16 E6 / Negativkontrolle	HPV 16 E7 / Negativkontrolle
HPV16-6	400.000	6,5	6,5	4,0	1,00	0,62
	200.000	3,5	1,5	3,0	0,43	0,86
	100.000	1,0	1,5	1,0	1,50	1,00
HPV16-7	400.000	39,0	33,0	41,5	0,85	1,06
	200.000	9,0	8,0	15,5	0,89	1,72
	100.000	3,0	4,0	5,5	1,33	1,83
HPV16-8	400.000	206,5	106,5	68,5	0,52	0,33
	200.000	49,0	26,0	28,0	0,53	0,57
	100.000	21,5	16,5	15,0	0,77	0,70
HPV16-9 A	400.000	75,0	56,5	49,0	0,75	0,65
	200.000	27,5	19,0	10,5	0,69	0,38
	100.000	7,0	9,0	4,5	1,29	0,64
HPV16-9 B	400.000	4,0	6,0	4,5	1,50	1,13
	200.000	3,5	0,5	0,5	0,14	0,14
	100.000	0,0	1,0	1,0	10,00	10,00
HPV16-10	400.000	188,0	165,5	38,5	0,88	0,20
	200.000	138,0	83,5	27,5	0,61	0,20
	100.000	60,0	28,5	9,0	0,48	0,15
HPV16-11 A	400.000	81,0	92,5	51,5	1,14	0,64
	200.000	35,5	39,5	27,0	1,11	0,76
	100.000	17,5	14,5	40,0	0,83	2,29
HPV16-11 B	400.000	94,5	88,5	90,5	0,94	0,96
	200.000	25,5	77,0	59,0	3,02	2,31
	100.000	22,0	44,0	38,5	2,00	1,75
HPV16-14	400.000	95,0	60,0	101,0	0,63	1,06
	200.000	18,0	20,0	12,5	1,11	0,69
	100.000	2,5	2,5	3,5	1,00	1,40
HPV16-15 A	400.000	---	---	---	---	---
	200.000	1,5	0,0	0,0	0,00	0,00
	100.000	0,0	0,5	0,0	5,00	0,00
HPV16-15 B	400.000	8,0	20	48,5	2,50	6,06
	200.000	38,5	58,5	5,5	1,52	0,14
	100.000	41,0	3	12,5	0,07	0,30
HPV16-16	400.000	---	---	---	---	---
	200.000	12,0	11,5	8,5	0,96	0,71
	100.000	2,0	5,5	3,0	2,75	1,50

Tab. 6.2 Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für IL-10

	Zellzahl pro Kultur	Mediane Spotzahl			Quotient	
		Negativ- kontrolle	HPV 16 E6	HPV 16 E7	HPV 16 E6 / Negativkontrolle	HPV 16 E7 / Negativkontrolle
HPV16-35	100.000	918,0	854,5	1228,5	0,93	1,34
	50.000	373,0	1136,5	630,5	3,05	1,69
	25.000	---	---	---	---	---
HPV16-36	100.000	123,0	844,5	582,5	6,87	4,74
	50.000	12,0	613,5	82,5	51,13	6,88
	25.000	6,5	350,0	13,0	53,85	2,00
HPV16-37	100.000	5,5	53,5	6,5	9,73	1,18
	50.000	50,	36,5	1,5	7,30	0,30
	25.000	1,5	4,5	2,0	3,00	1,33
HPV16-41	100.000	31,0	543,5	168,5	17,53	5,44
	50.000	18,0	296,0	31,5	16,44	1,75
	25.000	8,5	161,0	10,5	18,94	1,24
HPV16-42	100.000	2980,	539,0	257,5	1,81	0,86
	50.000	43,5	165	84,5	3,79	1,94
	25.000	14,5	63,5	20,0	4,38	1,38
HPV16-43	100.000	176,5	411,5	159,0	2,33	0,90
	50.000	34,0	224,0	54,0	6,59	1,59
	25.000	12,5	47,0	17,0	3,76	1,36
HPV16-45	100.000	357,5	959,5	462,0	2,68	1,29
	50.000	148,5	605,5	194,5	4,08	1,31
	25.000	31,0	330,0	77,5	10,65	2,50
HPV16-46	100.000	77,0	618,0	186,5	8,03	2,42
	50.000	22,0	170,5	31,5	7,75	1,43
	25.000	9,5	121,0	11,0	12,74	1,16
HPV16-47	100.000	15,5	106,0	17,5	6,84	1,13
	50.000	13,0	46,5	5,0	3,58	0,38
	25.000	2,5	24,5	3,0	9,80	1,20
HPV16-48	100.000	193,5	446,5	280,0	2,31	1,45
	50.000	38,0	138,0	66,0	3,63	1,74
	25.000	12,0	25,0	6,0	2,08	0,50
HPV16-50	100.000	364,0	864,0	254,5	2,37	0,70
	50.000	58,0	463,5	70,5	7,99	1,22
	25.000	90,	83,5	13,5	9,28	1,50
HPV16-51	100.000	766,5	1407,5	978,0	1,84	1,28
	50.000	121,5	1204,0	311,0	9,91	2,56
	25.000	43,0	761,0	84,0	17,70	1,95

Tab. 6.3 Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für Granzym B

	Zellzahl pro Kultur	Mediane Spotzahl			Quotient	
		Negativ- kontrolle	HPV 16 E6	HPV 16 E7	HPV 16 E6 / Negativkontrolle	HPV 16 E7 / Negativkontrolle
HPV16-35	100.000	30,0	51,0	38,0	1,70	1,27
	50.000	21,5	42,0	30,0	1,95	1,40
	25.000	---	---	---	---	---
HPV16-36	100.000	3,5	2,5	2,0	0,71	0,57
	50.000	0,5	0,5	0,5	1,00	1,00
	25.000	2,5	0,0	2,0	0,00	0,80
HPV16-37	100.000	4,5	2,5	5,0	0,56	1,11
	50.000	7,0	4,0	8,0	0,57	1,14
	25.000	2,5	2,0	5,0	0,80	2,00
HPV16-41	100.000	1,0	11,5	1,0	11,50	1,00
	50.000	3,0	9,0	3,0	3,00	1,00
	25.000	0,0	0,0	0,5	0,00	5,00
HPV16-42	100.000	1,5	10,5	1,0	7,00	0,67
	50.000	0,5	1,0	2,0	2,00	4,00
	25.000	1,0	0,0	1,0	0,00	1,00
HPV16-43	100.000	0,0	2,5	0,5	25,00	5,00
	50.000	0,0	2,0	1,0	20,00	10,00
	25.000	0,0	0,5	0,0	5,00	0,00
HPV16-45	100.000	31,5	15,5	13,5	0,49	0,43
	50.000	7,0	10,5	12,5	1,50	1,79
	25.000	17,5	19,5	17,0	1,11	0,97
HPV16-46	100.000	35,0	39,0	26,5	1,11	0,76
	50.000	38,5	22,5	31,0	0,58	0,81
	25.000	20,5	17,5	22,0	0,85	1,07
HPV16-47	100.000	3,0	2,0	4,5	0,67	1,50
	50.000	2,5	2,5	3,5	1,00	1,40
	25.000	1,0	2,0	2,0	2,00	2,00
HPV16-48	100.000	9,5	15,5	21,5	1,63	2,26
	50.000	3,0	1,0	7,5	0,33	2,50
	25.000	1,5	2,0	2,5	1,33	1,67
HPV16-50	100.000	14,5	13,0	20,5	0,90	1,41
	50.000	4,5	3,0	4,5	0,67	1,00
	25.000	4,0	2,0	7,0	0,50	1,75
HPV16-51	100.000	9,5	27,0	29,5	2,84	3,11
	50.000	8,0	28,5	16,5	3,56	2,06
	25.000	2,5	10,0	9,0	4,00	3,60
HPV16-52	100.000	---	---	---	---	---
	50.000	0,0	0,5	0,0	5,00	0,00
	25.000	0,5	0,0	0,0	0,00	0,00

Tab. 6.4 Einzelergebnisse der Zellzahltitrationen für Perforin

	Zellzahl pro Kultur	Mediane Spotzahl			Quotient	
		Negativ- kontrolle	HPV 16 E6	HPV 16 E7	HPV 16 E6 / Negativkontrolle	HPV 16 E7 / Negativkontrolle
HPV16-36	100.000	1,5	2,5	3,5	1,67	2,33
	50.000	1,5	3,0	0,5	2,00	0,33
	25.000	0,0	1,5	1,0	15,00	10,00
HPV16-37	100.000	0,0	3,5	1,0	35,00	10,00
	50.000	0,5	1,5	2,5	3,00	5,00
	25.000	0,5	0,5	1,0	1,00	2,00
HPV16-45	100.000	5,0	3,5	5,5	0,70	1,10
	50.000	4,5	4,0	2,5	0,89	0,56
	25.000	1,0	3,5	2,0	3,50	2,00
HPV16-46	100.000	21,5	36,0	21,0	1,67	0,98
	50.000	9,5	11,5	15,5	1,21	1,63
	25.000	2,5	9,0	9,5	3,60	3,80
HPV16-47	100.000	10,5	13,5	8,5	1,29	0,81
	50.000	10,5	3,0	4,5	0,29	0,43
	25.000	2,5	5,0	6,5	2,00	2,60
HPV16-48	100.000	8,0	3,5	8,5	0,44	1,06
	50.000	4,0	2,5	1,0	0,63	0,25
	25.000	1,5	2,5	4,0	1,67	2,67
HPV16-50	100.000	9,0	11,0	9,0	1,22	1,00
	50.000	9,0	12,5	6,0	1,39	0,67
	25.000	5,0	4,0	2,0	0,80	0,40
HPV16-51	100.000	28,0	26,0	29,5	0,93	1,05
	50.000	17,0	21,0	21,0	1,24	1,24
	25.000	4,5	6,0	13,0	1,33	2,89

Durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten Subpopulationen in Vollblut

Tab. 6.5 Einzelwerte von nicht HPV geimpften und HPV geimpften Probandinnen im Vergleich zu Normwerten aus der Routinediagnostik des Universitätsklinikums Essen

Zelltyp	Leukozyten:		Granulozyten		Monozyten		Lymphozyten:		CD19+ (B-Zellen)	CD16+CD56+CD3- (NK-Zellen)	CD3+ (T-Zellen)	CD4+			Ratio CD4+/CD8+	
	pro mL Blut	4000 -11300	% Leukozyten				% Lymphozyten					% CD3+ Zellen	CD8+ Zellen			
			40 - 78	5 - 10	20 - 44	8 - 20	2 - 25	56 - 81								
														33 - 61		10,4 - 44,2
Normwerte	5597,84	55,37	9,59	35,04	7,52	10,58	81,08	53,36	21,7	2,46						
Ungeimpfte Probandinnen	5326,95	57,59	8,14	34,27	14,7	16,71	67,55	35,99	25,72	1,4						
	6766,26	60,28	7,55	32,16	12,49	10,99	74,75	52,34	15,33	3,41						
	8952,12	57,43	6,21	36,37	4,74	11,35	82,7	49,16	28,84	1,7						
	5023,04	47,41	9,88	42,71	15,16	13,18	70,51	48,07	16,85	2,85						
	7489,61	70,56	2,94	26,51	8,14	20,2	70,48	42,2	21,9	1,92						
	6975,11	58,1	4,78	37,13	12,18	5,33	81,91	56,17	23,4	2,4						
	11235,24	53,06	6,05	40,9	22,81	18,18	58,26	36,65	16,76	2,19						
	6420,5	60,59	8,96	30,45	11,87	11,28	75,94	39,82	25,64	1,55						
	4843,84	52,59	5,78	41,63	10,44	10,75	76,81	46,86	22,37	2,09						
	7717,57	70,84	5,35	23,8	13,88	9,78	74,65	48,18	20,7	2,33						
Geimpfte Probandinnen	5877,53	50,13	5,94	43,93	5,76	6,39	84,84	42,57	22,28	1,91						
	2674,12	64,26	5,56	30,19	13,61	4	81,31	45,43	25,35	1,79						
	5355,62	51,01	3,73	45,26	9,58	10,85	78,24	47,3	21,16	2,27						
	4388,88	57,52	7,5	34,98	7,35	8,42	82,84	47,25	31,84	1,48						
	4244,35	55,2	6,18	38,62	9,82	7,31	81,95	60,76	14,32	4,24						
	5728,72	59,43	4,76	35,81	13,07	13,17	72,17	38,31	23,38	1,64						
	3865,28	54,83	6,11	39,05	7,35	18,37	72,82	44,1	22,1	6,72						
	7587,98	53,47	6,17	40,36	10,18	7,87	80,67	52,45	21,72	2,41						
	6413,18	79,36	4,83	15,81	9,84	12,92	75,67	46,55	18,25	2,55						
	6573,44	58,62	6,11	35,27	10,75	8,49	79,66	49,2	26,34	1,87						
5225,63	57,5	7,34	35,15	9,77	14,15	74,54	37,6	29,47	1,28							
4294,32	56,19	5,1	38,71	10,94	20,6	66,76	31,06	26,72	1,16							
6796,64	56,9	5,56	37,54	9,52	8,72	81,2	43,63	30,87	1,41							
11319,31	72,35	4,82	22,83	11,38	7,55	80,4	41,91	26,18	1,49							
6520,02	57,48	8,93	33,59	9,37	9,41	80,38	49,71	25,23	1,97							
7285,54	74,08	8,03	17,9	15,82	12,11	70,89	46,77	18,92	2,7							

7. Literaturverzeichnis

- Aetna Inc. (2014). *Clinical Policy Bulletin: Adoptive Immunotherapy and Cellular Therapy*. Abgerufen am 08. 05 2015 von http://www.aetna.com/cpb/medical/data/600_699/0641.html
- Affymetrix eBioScience. (kein Datum). *Human CD & Other Cellular Antigens*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.ebioscience.com/resources/human-cd-chart.htm>
- Affymetrix eBioScience. (kein Datum). *Human CD154 (CD40 Ligand) Recombinant Protein Carrier-Free*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.ebioscience.com/human-cd154-cd40-ligand-recombinant-protein.htm>
- Ahmadi, T., Flies, A., Efebera, Y., & Sherr, D. H. (2008). CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology* 124 , S. 129-140.
- American Cancer Society, Inc. (09. 05 2014). *Cancer Vaccines*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-cancer-vaccines>
- American Cancer Society, Inc. (12. 11 2014). *Types of targeted therapies used to treat cancer*. Abgerufen am 08. 05 2015 von [Targeted Cancer Therapy: http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/targetedtherapy/targeted-therapy-types](http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/targetedtherapy/targeted-therapy-types)
- ATCC. (kein Datum). *K-562 (ATCC CCL-243)*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-243.aspx>
- Barnes, L., Tse, L. L., Hunt, J. L., Brandwein-Gensler, M., Urken, M., Slootweg, P., et al. (2005). Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea: Introduction. In L. Barnes, J. W. Eveson, P. Reichart, & D. Sidransky, *World Health Organization Classification of Tumours - Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours* (S. 107-162). Lyon: IARC Press.
- BD Biosciences. (kein Datum). *BD FACSCALIBUR*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.bdbiosciences.com/ca/instruments/facscalibur/features/index.jsp>
- Begum, S., Cao, D., Gillison, M., Zahurak, M., & Westra, W. H. (2005). Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 11 , S. 5694-5699.
- Berger, C., Turtle, C. J., Jensen, M. C., & Riddell, S. R. (2009). Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. *Curr Opin Immunol* 21(2) , S. 224-232.
- Berger, T. G., & Schultz, E. S. (2003). Dendritic Cell-Based Immunotherapy. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 276 , S. 163-197.
- Besser, M. J., Shapira-Frommer, R., Treves, A. J., Zippel, D., Itzhaki, O., Hershkowitz, L., et al. (2010). Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients. *Clin Cancer Res* 16(9) , S. 2646-2655.
- BfArM. (06. 08 2014). *Arzneimittelzulassung, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte*. Abgerufen am 08. 05 2015 von http://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/zul/_node.html
- Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., et al. (1988). Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res.* 48 , S. 3282.
- Bresse, X., Goergen, C., Prager, B., & Joura, E. (2014). Universal vaccination with the quadrivalent HPV vaccine in Austria: impact on virus circulation, public health and cost-effectiveness analysis. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 14(2) , S. 269-281.

- Britten, C. M., Gouttefangeas, C., Welters, M. J., Pawelec, G., Koch, S., Ottensmeier, C., et al. (2008). The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays. *Cancer Immunol Immunother* 57, S. 289-302.
- Cancer Research UK. (27. 11 2014). *Cancer Vaccines*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Cancer - Treatment - Biological Therapy: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/biological/types/cancer-vaccines>
- Cancer Research Technology. (01. 10 2005). *Xenova licenses TA-CIN to CRT*. Abgerufen am 09. 06 2015 von <http://www.cancertechnology.co.uk/xenova-licenses-ta-cin-crt>
- Cardesa, A., & Nadal, A. (2011). Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatoven APA* 20(3), S. 161-173.
- Casati, A., Varghaei-Nahvi, A., Feldman, S. A., Assenmacher, M., Rosenberg, S. A., Dudley, M. E., et al. (2013). Clinical-scale selection and viral transduction of human naive and central memory CD8+ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 62(10), S. 1563-1573.
- Chaturvedi, A. K. (2012). Epidemiology and Clinical Aspects of HPV in Head and Neck Cancers. *Head and Neck Pathol* 6, S. 16-24.
- Chiu, Y.-L., Schneck, J. P., & Oelke, M. (2011). HLA-Ig Based Artificial Antigen Presenting Cells for Efficient ex vivo Expansion of Human CTL. *JoVe* 50, S. <http://www.jove.com/details.php?id=2801>.
- Chow, E. P., Read, T. R., Wigan, R., Donovan, B., Chen, M. Y., Bradshaw, C. S., et al. (2015). Ongoing decline in genital warts among young heterosexuals 7 years after the Australian human papillomavirus (HPV) vaccination programme. *Sex Transm Infect* 91(3), S. 214-219.
- Cornish, G. H., Sinclair, L. V., & Cantrell, D. A. (2006). Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* 108, S. 600-608.
- Czerkinsky, C. C., Andersson, G., Ekre, H. P., Nilsson, L. A., Klareskog, L., & Ouchterlony, O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 110, S. 29-36.
- Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O., & Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65, S. 109-121.
- Dayyani, F., Etzel, C. J., Liu, M., Ho, C.-H., Lippman, S. M., & Tsao, A. S. (2010). Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology* 2, S. 15-26.
- de Jong, A., O'Neill, T., Khan, A. Y., Kwappenberg, K. M., Chisholm, S. E., Whittle, N. R., et al. (2002). Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* 20, S. 3456-3464.
- de Jong, A., van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Franke, K. L., Geluk, A., et al. (2002). Frequent Detection of Human Papillomavirus 16 E2-specific T-helper Immunity in Healthy Subjects. *Canc Res* 62, S. 472-479.
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, S. 17-27.
- Deutsche Krebsgesellschaft. (16. 10 2013). *Kopf-Hals-Tumoren - Therapie*. Abgerufen am 07. 05 2015 von <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/therapie.html>

- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110 , S. 525-541.
- Dören, M., Gerhardus, A., Gerlach, F. M., Hornberg, C., Kochen, M. M., Kolip, P., et al. (25. 11 2008). *Wissenschaftler/innen fordern Neubewertung der HPV-Impfung und ein Ende der irreführenden Informationen*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Universität Bielefeld: https://www.uni-bielefeld.de/gesundhw/ag3/downloads/Stellungnahme_Wirksamkeit_HPV-Impfung_mit_Referenzen.pdf
- Dunkley, M., Miller, R. G., & Shortman, K. (1974). A modified 51Cr release assay for cytotoxic lymphocytes. *J Immunol Methods* 6 , S. 39-51.
- Erbo Christensen, J., Örding Andreassen, S., Pravsgaard Christensen, J., & Randrup Thomsen, A. (2001). CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8+ T cells and memory cells. *Int Immunol* 13 (4) , S. 593-600.
- Faridi, R., Zahra, A., Khan, K., & Idrees, M. (2011). Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal* 8 , S. 269-276.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *IJC* 127 , S. 2893-2917.
- Ferris, R. L., Martinez, I., Sirianni, N., Wang, J., Lopez-Albaitero, A., Gollin, S. M., et al. (2005). Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): a natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer* 41(5) , S. 807-815.
- Foster, B., Prussin, C., Liu, F., Whitmire, J. K., & Whitton, J. L. (2007). Detection of Intracellular Cytokines by Flow Cytometry. In *Current Protocols in Immunology (Suppl. 78)* (S. Unit 6.24). Wiley Online Library.
- Frisan, T., Levitsky, V., & Masucci, M. (2001). Generation of Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs). In J. B. Wilson, & G. H. May, *Epstein-Barr Virus Protocols (Methods in Molecular Biology Vol. 174)*. 125-127.
- Ganguly, N., & Parihar, S. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.* 34 , S. 113-123.
- Gattinoni, L., Powell Jr., D. J., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6(5) , S. 383-393.
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., et al. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92 , S. 709-720.
- Goedegebuure, P. S., Douville, L. M., Li, H., Richmond, G. C., Schoof, D. D., Scavone, M., et al. (1995). Adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with metastatic malignant melanoma and renal cell carcinoma: a pilot study. *J Clin Oncol* 13(8) , S. 1939-1949.
- Greiner Bio-One International. (kein Datum). *Separation*. Abgerufen am 08. 05 2015 von German Catalogue: http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/German%20Catalogue/08346_Kapitel_9_D.pdf
- Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., & Wang, X.-Y. (2013). Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. *Adv Cancer Res* 119 , S. 421-475.
- Haddad, R. I., & Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 359 , S. 1143-1154.

- Hariri, S., Bennett, N. M., Niccolai, L. M., Schafer, S., Park, I. U., Block, K. C., et al. (2015). Reduction in HPV 16/18-associated high grade cervical lesions following HPV vaccine introduction in the United States - 2008-2012. *Vaccine* 33(13), S. 1608-1613.
- Harrison, C., Britt, H., Garland, S., Conway, L., Stein, A., Pirotta, M., et al. (2014). Decreased Management of Genital Warts in Young Women in Australian General Practice Post Introduction of National HPV Vaccination Program: Results from a Nationally Representative Cross-Sectional General Practice Study. *PLoS ONE* 9(9), S. e105967.
- Heusinkveld, M., Goedemans, R., Briet, R. J., Nortier, J. W., Gorter, A., Smit, V. T., et al. (2012). Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int. J. Cancer* 131(2), S. 74-85.
- Hibbitts, S. (2010). TA-CIN, a vaccine incorporating a recombinant HPV fusion protein (HPV16 L2E6E7) for the potential treatment of HPV16-associated genital diseases. *Curr Opin Mol Ther* 12(5), S. 598-606.
- Hinrichs, C. S.; National Cancer Institute. (03 2015). *T Cell Receptor Immunotherapy Targetin HPV-16 E6 for HPV-Associated Cancers*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02280811>
- Hoffmann, M., Ihloff, A. S., Gorogh, T., Weise, J. B., Fazel, A., Krams, M., et al. (2010). p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int. J. Cancer* 127, S. 1595-1602.
- Huff, E. A. (17. 08 2013). *Führende Entwicklerin von Gardasil erleichtert ihr Gewissen und gibt zu, dass der Impfstoff nutzlos und tödlich ist*. Abgerufen am 08. 05 2015 von KOPP Verlag e.K.: <http://info.kopp-verlag.de/hintergruende/enthuellungen/ethan-a-huff/fuehrende-entwicklerin-von-gardasil-erleichtert-ihr-gewissen-und-gibt-zu-dass-der-impfstoff-nutzlos.html>
- Janetzki, S., Hoos, A., Melief, C. J., Odunsi, K., Romero, P., & Britten, C. M. (2013). Structured reporting of T cell assay results. *Cancer Immunity* 13, S. 13-15.
- June, C. H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.* 117, S. 1466-1476.
- June, C. H. (2007). Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 117, S. 1204-1212.
- Kanegane, H., & Tosato, G. (1996). Activation of naive and memory T cells ba interleukin-15. *Blood* 88, S. 230-235.
- Khanna, N., Stuehler, C., Conrad, B., Lurati, S., Krappmann, S., Einsele, H., et al. (2011). Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* 118(4), S. 1121-1131.
- Koeffler, H. P., & Golde, D. W. (1980). Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. *Blood* 56(3), S. 344-350.
- Kostareli, E., Holzinger, D., & Hess, J. (2012). New concepts for translational head and neck oncology: lessons from HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Frontiers in Oncology* 2, S. 36/01-36/10.
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Snijders, P. J., Castellsague, X., Meijer, C. J., Pawlita, M., et al. (2005). HPV16 semiquantitative viral load and serologic biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 115, S. 329-332.
- Lane, P., Brocker, T., Hubele, S., Padovan, E., Lanzavecchia, A., & McConnell, F. (1993). Soluble CD40 Ligand Can Replace the Normal T Cell-derived CD40 Ligand Signal to B Cell in T Cell-dependent Activation. *J Exp Med* 117, S. 1209-1213.
- Leibniz-Institut DSMZ. (kein Datum). *K-562 (ACC 10)*. Abgerufen am 08. 05 2015 von [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-10.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-10.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192)

- Leibniz-Institut DSMZ. (kein Datum). *UPCI-SCC-090 (ACC 670)*. Abgerufen am 08. 05 2015 von [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-670.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-670.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192)
- Lindemann, M., Böhmer, J., Zabel, M., & Grosse-Wilde, H. (2003). ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy* 33, S. 992-998.
- Lovelace, P., & Maecker, H. T. (2011). Multiparameter Intracellular Cytokine Staining. *Methods Mol Biol* 699, S. 165-178.
- Lozzio, B. B., & Lozzio, C. B. (1979). Properties and Usefulness of the Original K-562 Human Myelogenous Leukemia Cell Line. *Leuk Res* 3(6), S. 363-370.
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (1975). Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood* 45(3), S. 321-334.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2008). Durchflusscytometrie. In W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, & D. Myrtek, *Der Experimentator Immunologie*, 3. Auflage (S. 77-105). Spektrum Akademischer Verlag.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2008). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). In W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, & D. Myrtek, *Der Experimentator Immunologie* (3. Auflage) (S. 115-122). Spektrum Akademischer Verlag.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2008). Ficoll-Separation. In W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, & D. Myrtek, *Der Experimentator Immunologie* (3. Auflage) (S. 58-64). Spektrum Akademischer Verlag.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2008). Zellvermittelte Cytotoxizität. In W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, & D. Myrtek, *Der Experimentator Immunologie* (3. Auflage) (S. 221-226). Spektrum Akademischer Verlag.
- Malyguine, A. M., Strobl, S., Dunham, K., Shurin, M. R., & Sayers, T. J. (2012). ELIPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials. *Cells* 1, S. 111-126.
- Mander, A., Gouttefangeas, C., Ottensmeier, C., Welters, M. J., Low, L., van der Burg, S. H., et al. (2010). Serum is not required for ex vivo IFN-gamma ELISPOT: a collaborative study of different protocols from the European CIMT Immunoguiding Program. *Cancer Immunol Immunother* 59, S. 619-627.
- Martin, C. L., Reshmi, S. C., Ried, T., Gottberg, W., Wilson, J. W., Reddy, J. K., et al. (2008). Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma. Examination of 31 cell lines and review of the literature. *Oral Oncol* 44(4), S. 369-382.
- Masuda, M., Wakasaki, T., Toh, S., Shimizu, M., & Adachi, S. (2011). Chemoprevention of Head and Neck Cancer by Green Tea Extract: EGCG - The Role of EGFR Signaling and "Lipid Raft". *J. Oncol.*
- Mendes, E., & American Cancer Society, I. (16. 06 2014). *Immunotherapy: Disrupting the Cancer Treatment World*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Explore Research - ACS Research Updates - More Cancer Research News: <http://www.cancer.org/research/acsresearchupdates/more/immunotherapy-disrupting-the-cancer-treatment-world>
- Merck Sharp & Dohme Corp. (2014). *Gardasil*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.gardasil.com/>
- Miksits, K., & Hahn, H. (2003). Herpesviren: Zytomegalie-Virus (CMV). In K. Miksits, & H. Hahn, *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (3. Auflage) (S. 64). Springer-Verlag.
- Miller, A. B. (2013). Does HPV vaccination prevent cervical cancer? *Sout Asian J Cancer* 2(4), S. 198-199.

- Miltenyi Biotec. (kein Datum). *CD137 MicroBead Kit, human*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Cell Separation Reagents: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001600/IM0001647.ashx>
- Miltenyi Biotec. (kein Datum). *CD8+ T Cell Isolation Kit, human*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Cell Separation Reagents: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001900/IM0001984.ashx>
- Miltenyi Biotec. (kein Datum). *Human CD40-Ligand*. Abgerufen am 08. 05 2015 von MACS Cell Culture and Stimulation: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-culture-and-stimulation/cytokines-and-growth-factors/premium-and-research-grade/human-cd40-ligand.aspx>
- Miltenyi Biotec. (2012). *MACS Cytokines Catalog and product list*. Abgerufen am 08. 05 2015 von MACS Cell Culture and Stimulation: http://www.miltenyibiotec.co.jp/~media/Files/Navigation/Research/Stem%20Cell/Cytokines_ProductList_Dec2011_web.ashx
- Miltenyi Biotec. (kein Datum). *Pan T Cell Isolation Kit, human*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Cell Separation Reagents: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001900/IM0001985.ashx>
- Miltenyi Biotec. (kein Datum). *PepTivator Peptide Pools*. Abgerufen am 08. 05 2015 von NACS Cell Culture and Stimulation: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-culture-and-stimulation/stimulation-reagents/peptide-pools.aspx>
- Miltenyi Biotec. (kein Datum). *T Cell Activation/Expansion Kit, human*. Abgerufen am 08. 05 2015 von MACS Cell Culture and Stimulation: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001100/IM0001106.ashx>
- Morris, E., Hart, D., Gao, L., Tsallios, A., Xue, S., & Stauss, H. (2006). Generation of tumor-specific T-cell therapies. *Blood Rev* 20 , S. 61-69.
- Murphy, K. (2011). Chapter 1, 6, 9, 10 and 11. In *Janeway's Immunobiology (8th Edition)*. Taylor & Francis Ltd.
- National Cancer Institute. (15. 11 2011). *Cancer Vaccines*. Abgerufen am 07. 05 2015 von <http://www.cancer.gov/cancertopics/causes-prevention/vaccines-fact-sheet>
- National Cancer Institute. (15. 11 2011). *Cervarix*. Abgerufen am 07. 05 2015 von Cancer Vaccines: <http://www.cancer.gov/common/popUps/popDefinition.aspx?id=CDR0000658364&version=Patient&language=English>
- National Cancer Institute. (15. 11 2011). *Gardasil*. Abgerufen am 07. 05 2015 von Cancer Vaccines: <http://www.cancer.gov/common/popUps/popDefinition.aspx?id=CDR0000661954&version=Patient&language=English>
- National Cancer Institute. (17. 10 2014). *Immunotherapy: Using the Immune System to Treat Cancer*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Research & Funding: <http://www.cancer.gov/researchandfunding/areas/treatment/immunotherapy-using-immune-system>
- National Institutes of Health. (06. 05 2015). *Head and Neck Cancer*. Abgerufen am 07. 05 2015 von U.S. Library of Medicine: MedlinePlus: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/headandneckcancer.html>
- Nomura, L., Maino, V. C., & Maecker, H. T. (2008). Standardization and Optimization of Multiparameter Intracellular Cytokine Staining. *Cytometry Part A* 73A , S. 984-991.
- Novartis Pharma GmbH. (2014). *Proleukin S*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Rote Liste PatientenInfoService: <http://www.patienteninfo-service.de/a-z-liste/pq/proleukinR-s-18-mio-ie-pulver-zur-herstellung-einer-injektions-oder-infusionsloesung/>

- Nowacki, T. M., Bettenworth, D., Ross, M., Heidemann, J., Lehmann, P. V., & Lügering, A. (2012). Cytomegalovirus (CMV)-Specific Perforin and Granzyme B ELISPOT Assays Detect Reactivation of CMV Infection in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 1, S. 35-50.
- OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG. (kein Datum). *CASY TTC*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Zellkultur + Zellanalyse, Zell-Zählung / CASY: <http://www.ols-bio.de/zellkultur-zellanalyse/zell-zaehlung-casy/260/casy-ttc>
- Olsen, J., & Jörgensen, R. (2015). Revisiting the cost-effectiveness of universal HPV-vaccination in Denmark accounting for all potentially vaccine preventable HPV-related diseases in males and females. *Cost Eff Resour Alloc* 13(4) .
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, S. 74-108.
- Paul-Ehrlich-Institut. (2012). *Arzneimittel für Neuartige Therapien (ATMP - Advanced Therapy Medicinal Products) - Regulatorische Anforderungen und Praktische Hinweise*. Langen.
- Perkin Elmer Inc. (kein Datum). *DELFLIA Cytotoxicity Kit*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Family/ID/DELFLIA%20Cytotoxicity%20Reagents%20Family>
- Rabe, S. (17. 01 2015). *HPV - Die Impfung*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Impf-Info: <http://www.impf-info.de/die-impfungen/hpv/138-hpv-die-impfung>
- Ramos, C. A., Narala, N., Vyas, G., Leen, A. M., Gerdemann, U., Sturgis, E. M., et al. (2013). Human Papillomavirus Type 16 E6/E7-specific Cytotoxic T Lymphocytes for Adoptive Immunotherapy of HPV-associated Malignancies. *J Immunother* 36, S. 66-76.
- Rautava, J., & Syrjänen, S. (2012). Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. *Head and Neck Pathol* 6, S. 3-15.
- RayBiotech, Inc. (kein Datum). *C-Series Arrays: Target Protein Lists*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <http://www.raybiotech.com/c-series-arrays-list-of-targets.html>
- RayBiotech, Inc. (kein Datum). *C-Series: Membrane-Based Antibody Arrays*. Abgerufen am 08. 05 2015 von <https://www.raybiotech.com/c-series-membrane-based-antibody-arrays.html>
- Reimers, N., Kasper, H. U., Weissenborn, S. J., Stutzer, H., Preuss, S. F., Hoffmann, T. K., et al. (2007). Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int. J. Cancer* 120, S. 1731-1738.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12(4), S. 269-281.
- Rickert, V. I., Auslander, B. A., Cox, D. S., Rosenthal, S. L., Rupp, R. E., & Zimet, G. D. (2015). School-based HPV immunization of young adolescents: Effects of two brief health interventions. *Hum Vaccin Immunother* 11(2), S. 315-321.
- Robert-Koch-Institut & GEKID e.V. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe 2013*. Berlin.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8(4), S. 299-308.
- Sanguine Biosciences, Inc. (12. 12 2012). *Identification of CD4+ TH1, TH2, and TH17 populations in human PBMC*. Abgerufen am 08. 05 2015 von Bioscience Blog: <http://technical.sanguinebio.com/identification-of-cd4-th1-th2-and-th17-populations-in-human-pbmc/>
- Sanofi Pasteur MSD. (März 2014). Gardasil. *Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels)* .

- Santegoets, S. J., Turksma, A. W., Suhoski, M. M., Stam, A. G., Albelda, S. M., Hooijberg, E., et al. (2013). IL-21 promotes the expansion of CD27+CD828+ tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells. *J Transl Med* 11 , S. 37-46.
- Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B., & Greenberg, P. D. (2009). T Cell Receptor Gene Therapy for Cancer. *Human Gene Therapy* 20 , S. 1240-1248.
- Scholten, K. B., Kramer, D., Kueter, E. W., Graf, M., Schoedl, T., Meijer, C. J., et al. (2006). Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin Immunol* 119 , S. 135-145.
- Scholten, K. B., Schreurs, M. W., Ruizendaal, J. J., Kueter, E. W., Kramer, D., Veenbergen, S., et al. (2005). Preservation and redirection of HPV16E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer. *Clin Immunol* 114 , S. 119-12.
- Schreurs, M. W., Kueter, E. W., Scholten, K. B., Lemonnier, F. A., Meijer, C. J., & Hooijberg, E. (2005). A single amino acid substitution improves the in vivo immunogenicity of the HPV16 oncoprotein E7(11-20) cytotoxic T lymphocyte epitope. *Vaccine* 23 , S. 4005-4010.
- Schreurs, M. W., Scholten, K. B., Kueter, E. W., Ruizendaal, J. J., Meijer, C. J., & Hooijberg, E. (2003). In Vitro Generation and Life Span Extension of Human Papillomavirus Type 16-specific, Healthy Donor-Derived CTL Clones. *J Immunol* 171 , S. 2912-2921.
- Schultz, E. S., Schuler-Thurner, B., Stroobant, V., Jenne, L., Berger, T. G., Thielemanns, K., et al. (2004). Functional Analysis of Tumor-Specific Th Cell Responses Detected in Melanoma Patients after Dendritic Cell-Based Immunotherapy. *J Immunol* 172 , S. 1304-1310.
- Shafer-Weaver, K., Sayers, T., Strobl, S., Derby, E., Ulderich, T., Baseler, M., et al. (2003). The Granzyme B ELISPOT assay: an alternative to the ⁵¹Cr-release assay for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *J Transl Med* 1(1) , S. 14.
- Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000). Activated and Memory CD8+ T Cells Can Be Distinguished by Their Cytokine Profiles and Phenotypic Markers. *J Immunol* 164 , S. 208-216.
- Smith, M. A., & Canfell, K. (2014). Incremental Benefits of Male HPV Vaccination: Accounting for Inequality in Population Uptake. *PLoS ONE* 9(8) , S. e101048.
- Ständige Impfkommission am RKI. (2012). *Epidemiologisches Bulletin* 30/2012. Berlin: Robert-Koch-Institut.
- Stanley, M. (2014). HPV vaccination in boys and men. *Hum Vaccin Immunother* 10(7) , S. 2109-2111.
- Stasche, N., & Schmieder, A. (2014). Kopf-Hals-Karzinome. In J. Preiß, W. Dornoff, A. Schmieder, F. Honecker, & J. Claßen, *Taschenbuch Onkologie: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2014/2015* (S. 125-132). Zuckschwerdt.
- Sun, Q., Pollok, K. E., Burton, R. L., Dai, L. J., Britt, W., Emanuel, D. J., et al. (1999). Simultaneous Ex Vivo Expansion of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Using B-Lymphoblastoid Cell Lines Expressing Cytomegalovirus pp65. *Blood* 95(9) , S. 3242-3250.
- Sutherland, A. P., Joller, N., Michaud, M., Liu, S. M., Kuchroo, V. K., & Grusby, M. J. (2013). IL-21 Promotes CD8+ CTL Activity via the Transcription Factor T-bet. *J Immunol* 190 , S. 3977-3984.
- Syrjänen, K. J., & Surjänen, S. M. (1981). Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 43(4) , S. 181-194.

- Syrjänen, K., Syrjänen, S., & Pyrhönen, S. (1982). Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas. *J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 44 , S. 323-334.
- Syrjänen, K., Syrjänen, S., Lamberg, M., Pyrhönen, S., & Nuutinen, J. (1983). Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 12 , S. 418-424.
- Syrjänen, S. (2010). The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of Oncology* 21(Suppl. 7) , S. 243-245.
- Syrjänen, S., Lodi, G., von Bültzingslöwen, I., Aliko, A., Arduino, P., Campisi, G., et al. (2011). Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Diseases* 17 (Suppl. 1) , S. 58-72.
- Tabrizi, S. N., Brotherton, J. M., Kaldor, J. M., Skinner, S. R., Liu, B., Bateson, D., et al. (2014). Assessment of herd immunity and cross-protection after a human papillomavirus vaccination programme in Australia: a repeat cross-sectional study. *Lancet Infect Dis* 14(10) , S. 958-966.
- Taguchi, T., McGhee, J. R., Coffman, R. L., Beagley, K. W., Eldridge, J. H., Takatsu, K., et al. (1990). Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods* 128(1) , S. 65-73.
- Tey, S.-K., Bollard, C. M., & Heslop, H. E. (2006). Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunology and Cell Biology* 84 , S. 281-289.
- The Ella Institute. (kein Datum). *TIL immunotherapy*. Abgerufen am 08. 05 2015 von http://www.ella.sheba.co.il/e/_TIL_Immunotherapy
- Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 26 , S. 13-21.
- Tosato, G., & Cohen, J. I. (2007). Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-Immortalized B Cell Lines. In *Current Protocols in Immunology* (Suppl. 76) (S. Unit 7.22). Wiley Online Library.
- Trivedi, D., Williams, R. Y., O'Reilly, R. J., & Koehne, G. (2005). Generation of CMV-specific T lymphocytes using protein-spanning pools of pp65-derived overlapping pentadecapeptides for adoptive immunotherapy. *Blood* 105(7) , S. 2793-2801.
- Universitätsklinikum Heidelberg. (07. 05 2015). *Bösartige Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereichs*. Abgerufen am 07. 05 2015 von Hals-Nasen-Ohrenklinik: Behandlungsspektrum: <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Boesartige-Erkrankungen-des-Kopf-Hals-Bereichs.9371.0.html>
- US National Institutes of Health. (03 2015). *Clinical Trial Safety and Feasibility of TA-CIN Vaccine in Combination With GPI-0100 Adjuvant in Patients With a History of HPV16 Associated Cervical Cancer*. Abgerufen am 09. 06 2015 von ClinicalTrials.gov: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02405221>
- Uttenthal, B. J., Chua, I., Morris, E. C., & Stauss, H. J. (2012). Challenges in T cell receptor gene therapy. *J Gene Med* 14 , S. 386-399.
- van Leeuwen, E. M., Gamadia, L. E., Baars, P. A., Remmerswaal, E. B., ten Berge, I. J., & van Lier, R. A. (2002). Proliferation Requirements of Cytomegalovirus-Specific, Effector-Type Human CD8+ T Cells. *J Immunol* 169 , S. 5838-5843.
- Vannucchi, A. M., Glinz, S., Bosi, A., Caporale, R., & Rossi-Ferrini, P. (2001). Selective ex vivo expansion of cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes using dendritic cells pulsed with a human leucocyte antigen A*0201-restricted peptide. *Br J Haematol* 113 , S. 479-482.

- Vassalli, G. (2013). Dendritic Cell-Based Approaches for Therapeutic Immune Regulation in Solid-Organ Transplantation. *J Transplant* 2013, S. 17.
- Watanabe, K., Suzuki, S., Toji, S., Kawase, T., Takahashi, T., Kuzushima, K., et al. (2008). CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. *Int J Hematol* 88(3), S. 311-320.
- Wölfl, M., Merker, K., Morbach, H., Van Gool, S. W., Eyrich, M., Greenberg, P., et al. (2011). Primed tumor-reactive multifunctional CD62L+ human CD8+ T cells for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 60(2), S. 173-186.
- Wu, C., Liu, Y., Zhao, Q., Chen, G., Chen, J., Yan, X., et al. (2010). Soluble CD40 ligand-activated human peripheral B cells as surrogated antigen presenting cells: A preliminary approach for anti-HBV immunotherapy. *Virology J* 7, S. 370-376.
- Yates, J. L., Warren, N., & Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, S. 812-815.
- Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S. E., Oh, S., Kovanen, P. E., Hinrichs, C. S., et al. (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* 201(1), S. 139-148.
- Zentz, C., Wiesner, M., Man, S., Frankenberger, B., Wollenberg, B., Hillemann, P., et al. (2007). Activated B Cells Mediate Efficient Expansion of Rare Antigen-Specific T Cells. *Human Immunol* 68, S. 75-85.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochem. Biophys. Acta* 1288, S. 55-78.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and Cancer: from Basic Studies to Clinical Application. *Nature Rev Cancer* 2, S. 342-350.

Danksagung

Allen Personen, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle DANKE sagen.

Zuerst möchte ich mich bei *Herrn Prof. Peter A. Horn* bedanken, der die Bearbeitung dieses interessanten Projekts in seinem Institut für Transfusionsmedizin am UK Essen überhaupt ermöglicht hat. Danke für diese Möglichkeit. Bei *Frau Prof. Monika Lindemann* möchte ich mich sehr herzlich dafür bedanken, dass sie mich für dieses komplexe Projekt in Ihre Arbeitsgruppe geholt & mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Einen ganz großen Dank für deine Unterstützung, Beratung & Diskussion bezüglich des Projekts & allem anderen. Weiterhin vielen Dank an *Herrn Prof. Sven Brandau*, Leiter der Forschungsabteilung der HNO-Klinik am UK Essen, für die sehr gute Kooperation und Unterstützung in jeder Phase des Projekts.

Ohne die Kooperationspartner des *Netzwerks Zelluläre Tumor Therapie NRW (NZT.NRW)* am UK Essen, der Universität Köln & der Firma Miltenyi Biotec wäre dieses Projekt nicht zustande gekommen, deshalb auch hier an alle Beteiligten ein großes Dankeschön. Insbesondere ein Dank an die Firma Miltenyi Biotec für das zur Verfügung stellen des MACSiMAG Separators und des TransAct Reagents.

Einen herzlichen Dank an alle Mitarbeiter & Kollegen im Institut für Transfusionsmedizin im Robert-Koch-Haus & im OPZII & natürlich auch in „meinem Zweitlabor“, der Forschungsabteilung der HNO-Klinik. Danke für die wunderbaren sozialen Kontakte & Gespräche, seien sie nun fachlich gewesen oder auch nicht. Besonders namentlich erwähnen möchte ich an dieser Stelle *Frau Dr. Marianne Breyer*, die mir jederzeit mit Apheresesets & Informationen zu allen Fragen zur Seite stand, *Frau Petra Altenhoff* & *Frau Kirsten Bruderek*, die mir mit den zur Verfügung gestellten Zell-Linien immer sehr kompetent weitergeholfen haben & auch sonst immer ein offenes Ohr für alle Sorgen & Nöte hatten. Außerdem auch einen Dank für die kurzen Gespräche über alles Mögliche an *Sandra Wasielewski*, *Ulrike Kaiser*, *M. Sc. Johana Klein*, *M. Sc. Katrin Moses* & *M. Sc. Robert Petri*. An die tolle Arbeitsgruppe, die mich so herzlich im Labor willkommen geheißen & unterstützt hat, wo es nur geht, ein weiteres besonders großes Dankeschön. *Sabine Wortmann*, *Monika Huben*, *Martina Praast*, *Bärbel Nyadu*, *Birgit Thiam*, ihr wart & seid ein gutes Team.

Der dickste Dank geht an meinen direkten Kooperationspartner & sehr, sehr guten Freund *Tim „the Hamster“ Wehrs*. Ich wüsste wirklich nicht, wie ich das alles ohne dich so hinbekommen hätte! Danke für einfach alles, dein immer offenes Ohr, die guten Zeiten & dass du die schweren ein wenig leichter gemacht hast.

Meinen weiteren Freunden *Sven*, *Effe* & *Hang* vielen Dank für die wunderbaren, lustigen Abende & Wochenende bei Speis & Spiel! Auf dass noch viele folgen mögen!

Ein letzter besonderer Dank geht an *meine Eltern*. Ohne euch wäre ich heute nicht da, wo ich bin. Danke, dass ihr mir mit eurem Vertrauen immer den Rücken gestärkt habt & mich zu dem Menschen gemacht habt, der ich heute bin. Ich hoffe, ihr könnt so stolz auf mich sein, wie ich es auf euch bin. Mama, du bist die Beste und ich bewundere dich für deine Stärke. Ich wünschte, Papa hätte dies noch erleben können.

Außerdem - last but not least - danke ich meinem geliebten Mann, *Stephan „Lucki“*, denn ohne dich wäre ich am Ende nicht hier gelandet & hätte das in dieser Form gar nicht angefangen. Danke, dass du mich vorbehaltlos unterstützt, du bist mein Fels & das liebe Gesicht, dass am Ende des Tages alles wieder gut werden lässt.

Falls ich jemanden vergessen habe namentlich zu erwähnen, möchte ich mich entschuldigen, ich danke natürlich allen, die mich in jeder Phase zu kleinen & großen Teilen unterstützt haben.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Essen, September 2015

Kongressbeiträge

Haller S., Wehrs T.P., Brandau S., Horn P.A., Lindemann M. Adoptive Immunotherapy As Therapeutic Option To Treat Human Papilloma Virus Associated Tumours. Clin.Lab. 2012 (58)08. (Vortrag, 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI), 06. - 08.09.2012)

Wehrs T.P., Brandau S., **Haller S.**, Lindemann M., Gauler T. Vergleich von CMV- und HPV-spezifischen T-Zellen nach Anreicherung und Expansion für die Anwendung im adoptiven T-Zelltransfer. 3. Workshop zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie. (Vortrag, 01. - 02.03.2013)

Wehrs T.P., Brandau S., **Haller S.**, Lindemann M., Gauler T. T cells specific for CMV and HPV differ substantially in prevalence, phenotype and functionality after expansion for adoptive T-cell transfer. Abstract Book of CIMT 2013 (<http://www.cimt.eu/meetings/>), p82. (Poster, 11. CIMT Annual Meeting, 14. - 16.05.2013)

Haller S., Wehrs T.P., Brandau S., Horn P.A., Lindemann M. Adoptive Immunotherapy As Therapeutic Option To Treat Human Papilloma Virus Associated Tumours. Abstract Book of CIMT 2013 (<http://www.cimt.eu/meetings/>), p120. (Poster, 11. CIMT Annual Meeting, 14. - 16.05.2013)

Wehrs T.P., **Haller S.**, Lindemann M., Gauler T., Brandau S.. T cells specific for CMV and HPV differ substantially in prevalence, phenotype and functionality after expansion for adoptive T-cell transfer. European Workshop on Immune Integrity of the International Research Universities Network (IRUN). (Poster, 27. - 28.03.2013)

Haller S., Wehrs T.P., Brandau S., Horn P.A., Lindemann M. Monitoring Immune Responses To Develop A Cellular Immunotherapy For Human Papilloma Virus Associated Tumours. Abstract Book of DGI 2013 (<http://www.dgi2013.de/index.php/abstracts>), Abstract Preview DGI 2013-5: S3-S4 and Clin.Lab. 2013 (59)08. (Poster, 21. Jahrestagung der DGI, 05. - 07.09.2013)

Wehrs T.P., **Haller S.**, Lindemann M., Gauler T., Brandau S.. T cells specific for CMV and HPV differ substantially in prevalence, phenotype and functionality after expansion for adoptive T-cell transfer. Abstract Book of DGfI (http://domains.conventus.de/fileadmin/media/2013/dgfi/Programm/DGfI_2013_Abstract_book.pdf), p426. (Poster, 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), 11. - 14.09.2013)

Haller S., Wehrs T.P., Brandau S., Horn P.A., Lindemann M. Adoptive Immunotherapy As Therapeutic Option To Treat Human Papilloma Virus Associated Tumours. Transfus Med Hemother 2013 (40, Suppl. 1). (Poster, Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 24. - 27.09.2013, Posterpreisträgerin)

Haller S., Wehrs T.P., Brandau S., Horn P.A., Lindemann M. Monitoring Immune Responses To Develop A Cellular Immunotherapy For Human Papilloma Virus Associated Tumours. 11. Wildbad Kreuth Symposion zur Hämotherapie. (Poster, 24. - 25.01.2014)

Haller S., Wehrs T.P., Brandau S., Horn P.A., Lindemann M. Monitoring Immune Responses To Develop A Cellular Immunotherapy For Human Papilloma Virus Associated Tumours. Tissue Antigens 2014 (84): 5-164, June, 2014. (Vortrag, 28th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), 25. - 28.06.2014)

Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Etablierung eines Herstellungsprozesses für die ex vivo Expansion autologer HPV-spezifischer Lymphozyten unter GMP-Bedingungen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Stefanie Luckau befürworte.

Essen, den _____

(Prof.in Dr. med. Monika Lindemann)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

(Stefanie Luckau)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

(Stefanie Luckau)